

Susann Sundqvist

Tripeptidin IPP:n kvantitointimenetelmän kehitys eri HPLC-kolonneilla sekä yhdisteen varmistus MALDI:lla ja ESI/MS:llä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

3.5.2016

<p>Tekijä(t) Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Susann Sundqvist Tripeptidin IPP:n kvantitointimenetelmän kehitys, eri HPLC-kolonneilla sekä yhdisteen varmistus MALDI:lla ja ESI/MS:llä</p> <p>67 sivua + 5 liitettä 3.5.2016</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Laboratorioala</p>
<p>Ohjaaja(t)</p>	<p>Vanhempi tutkija Maciej Lalowski Lehtori Miikka Kuivikko</p>
<p>Työ suoritettiin Helsingin yliopiston Medicumin Lääketieteellisillä laitoksilla, Kliinisen Proteomiikan yksikössä, Helsinki, Suomi. Tripeptidi isoleusyyliprolyliproliini (IPP) määrittäminen kuuluu Farmakologian yksikön tutkimuksiin, jossa pyritään löytämään terveyteen suotuisasti vaikuttavia ruoka-aineita. Tripeptidi on pooliton ja hyvin hydrofobinen joka tekee sen ongelmallinen erotettavaksi kromatografian keinoin (peptidin heikon interaktion kolonnin matrisin kanssa).</p> <p>Työn tarkoituksena oli löytää sopiva protokolla IPP:n kromatografiseen analyysiin. Käytännössä kokeiltiin useita eri kolonneja joita kokeiltiin eri kromatografisissa olosuhteissa. Kokeet suoritettiin kahdella eri kromatografialaitteella SMART (entinen Pharmacia) ja ÄKTA flpc (GE Healthcare Life Sciences). MALDI-TOF:lla ja sähkösumutus-ionisaatiomassaspektrometreillä (Bruker Daltonics) varmennettiin tripeptidi.</p> <p>Työssä käytettiin kahta päätyyppiä olevia kolonneja, nimittäin käänteisfaasikromatografiassa (RPC) end capping muokatuilla oktadekyyli-silanolikolonneja (C18) ja paljas silikapartikkeli kolonneja HILIC:ssä. Käytetyt puskurit olivat asetonitrilipohjaisia. Puskurin pH säätöön käytettiin trifluorietikkahappoa (TFA, 0,1 %), 20 mM ammoniumformaattia (pH 10) tai 10 mM ammoniumformaattia (pH 4,5) jota käytettiin HILIC kromatografiaan. Kolonneista oli kolme ODS- ja kolme HILIC -kolonneja</p> <p>Paras erotus saatiin yhdistelmällä Watersin X Bridge -kolonnilla (C18) 20 mM ammoniumformaattia (pH 10) ja SMART -laitteistolla. Peptidi eluutui kapeana vyöhykkeenä virtauksen ollessa 0,1 ml/min isokraattisella gradientilla. Watersin HILIC SILICA -kolonni ja 10 mM ammoniumformaatti puskurin (pH 4,5) tulokset vaikuttivat lupaavilta ja saatuja tuloksia voidaan hyödyntää tulevaisuuden tutkimuksissa.</p> <p>Valittiin IPP tripeptidin erottumiseen ja kvantitointiin kaksi RP C18 -kolonnia (Watersin X Bridge ja Kinetexin EVO) käytettäväksi joko happamalla tai emäksisellä puskurilla. Näillä olosuhteilla voitiin luotettavasti erottaa ja kvantitoida 0,1 µg synteettistä peptidiä. Samankaltaisia tuloksia saatiin IPP:n rotan suolen läpäisevyyspilottitutkimuksessa (yhteistyössä Prof. Riitta Korpelan ryhmän kanssa, Farmakologian osastolta).</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>HPLC, IPP, tripeptidi, C18, RP, HILIC, MALDI-TOF, ESI/MS</p>

Author(s) Title Number of Pages Date	Susann Sundqvist Quantification of tripeptide IPP using different HPLC columns and verification of the analyte by MALDI-TOF and ESI-mass spectrometry 67 pages + 5 appendices 3 May 2016
Degree	Laboratory analyst
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Maciej Lalowski, Adjunct Professor Miikka Kuivikko, Principal Lecturer
<p>The practical work of this thesis was performed at the Meilahti Clinical Proteomic Core Facility; Medicum, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland. The tripeptide isoleucine-proline-proline (IPP), has been studied at the Department of Pharmacology, in research projects related to general nutrition. The tripeptide is non-polar and heavily hydrophobic, which makes it problematic in chromatographic resolutions (poor interaction with the column matrix).</p> <p>The aim of this thesis project was to establish a suitable protocol for chromatographic analysis of IPP. In practice, several different analytical columns and chromatographic conditions were utilized in the thesis project. The experiments were performed using SMART (former Pharmacia) and ÄKTA fplc (GE Healthcare Life Sciences) chromatography systems. MALDI-TOF and electrospray ionization mass spectrometry (Bruker Daltonics) was used to verify the identity/quantity of tripeptide.</p> <p>In this thesis project, two types of matrices, namely end-capped octadecylsilane (ODS, C18) in reverse-phase (RP) and plain silica in HILIC type chromatography, were utilized. As mobile phase, acetonitrile-based buffers were used. For pH alterations, either trifluoroacetic acid (TFA, 0.1%), 20 mM ammonium formate (pH 10) or 10 mM ammonium formate (pH 4.5) for HILIC chromatography were used. Three types of ODS and three HILIC silica columns were tested for resolving the IPP.</p> <p>The best resolution was achieved with the Waters X Bridge column (C18), using 20 mM ammonium formate buffer (pH 10) and the SMART system. The peptide eluted as a narrow peak with the flow 0.1 ml/minute, and in isocratic conditions. Waters HILIC SILICA column and ammonium formate (pH 4.5) gave promising results, which can be utilized in the future studies.</p> <p>As the final recommendation for chromatographic resolving of IPP tripeptide, two RP C18 columns were chosen (Waters X Bridge column and Kinetex EVO), operating with either acidic or alkaline buffers. Approximately 0.1 µg of synthetic peptide could be resolved and quantified in these conditions. Similar results were gained in pilot experiments with IPP crossing the rat gut barrier (in collaboration with Prof. Riitta Korpela's group, Dept. of Pharmacology).</p>	
Keywords	HPLC, IPP, tripeptide, C18, RP, HILIC, MALDI-TOF, ESI/MS

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Tripeptidi IPP:n rakenne	2
2.1	Peptidin yleinen rakenne	2
2.2	Ominaisuudet	3
2.2.1	Isoleusiini	5
2.2.2	Prolini	5
3	Nestekromatografia	6
3.1	Yleistä	6
3.2	Liikkuva faasi	6
3.3	Stationäärifaasi	7
3.4	Näytteenotto	8
3.5	Pumput	9
3.5.1	Ruiskupumput	9
3.5.2	Resiprookkipumput	10
3.6	Detektori	11
4	Massaspektrometrit ESI (electrospray ionization) ja TOF (time-of-flight)	12
4.1	Massaspektrometri ESI (ioniloukku)	12
4.2	Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio	14
5	Kolonne	19
5.1	Hydrofiilisen vuorovaikutuksen kromatografia	20
5.2	Käänteisfaasikromatografian kolonnit	21
5.3	Normaalifaasikromatografian kolonnit	22
6	Kromatografian suureet	22
7	Tilastomatemaattiset suureet tulosten oikeellisuuden määrittämiseen	24
8	Käytetty laitteisto	26
8.1	GE Smart (Pharmacia)	26
8.2	GE ÄKTApurifier 10 (Pharmacia)	27
8.3	Bruker MALDI ultrafleXtreme™ (MALDI/TOF/TOF)	28

8.4	Bruker Esquire 6000 (ESI/MS)	30
9	Käytetyt pienlaitteet, kemikaalit ja työturvallisuus	30
10	Testattavat kolonnit	31
10.1	Applied Biosystems PTH C18 (5.0 µm, 4.6 * 220 mm)	31
10.2	Waters Atlantis HILIC SILICA (3.0 µm, 2.1 * 100 mm)	32
10.3	Phenomenex Kinetex HILIC Silica (2.6 µm, 2.1 * 50 mm, 100 Å)	32
10.4	Waters Acquity UPLC BEH HILIC (1.7 µm, 1.0 * 100 mm)	33
10.5	Waters X Bridge C18 (5 µm, 4.6 * 150 mm, 100 Å)	33
10.6	Phenomenex Kinetex EVO C18 (5 µm, 4,6 * 250 mm, 100Å)	34
11	Käytetyt puskuriparit	34
11.1	Käänteisfaasikromatografian hapan puskuri	35
11.2	Käänteisfaasikromatografian emäksinen puskuri	36
11.3	HILIC-kolonnien hapan suolapuskuri	36
12	Työn kulku	37
12.1	Peptidin punnitus	37
12.2	Liuosten teko	37
12.3	Puskurit ja niiden teko	37
12.3.1	Käänteisfaasikromatografian hapan puskuri	38
12.3.2	Käänteisfaasikromatografian emäksien puskuri (pH 10)	38
12.3.3	HILIC-kolonnien hapan suolapuskuri	40
12.4	Koeajot	41
12.4.1	Gradientti	41
12.4.2	Step-gradientti	42
12.4.3	Jälkivarmistus	43
13	Tulokset	44
13.1	Peptidi, kantaliuoksen teko	44
13.2	Laimennokset standardisuoraa varten	45
13.3	Standardiliuosten laimennoksia	46
13.4	Hydrofiilisen vuorovaikutuksen kromatografian kolonnien koeajot	47
13.4.1	Watersin Atlantis HILIC SILICA (3.0 µm, 2.1 * 100 mm)	48
13.4.2	Kinetex HILIC SILICA (3.0 µm, 2.1 * 100 mm)	48
13.4.3	Waters Acquity UPLC BEH HILIC	50
13.5	ÄKTA ja C18-kolonnit; PTH ja EVO	50

13.5.1	ÄKTA:lla ja PTH C18-kolonnilla, kaksi eri gradienttia	50
13.5.2	IPP näytteiden tuloksia	55
13.5.3	Standardi IPP -Ringer-liuoksen pitoisuuden määrittäminen	56
13.5.4	PTH C18-kolonnilla ja SMART:lla suoritettu gradienttiajo	57
13.6	Tulokset X Bridge	59
13.7	Kinetex EVO C18-kolonneilla	63
14	Päätelmät ja pohdinta	65
	Lähteet	68

Liitteet

Liite 1. Työohje X Bridge ja ammoniumformaatti (pH 10) : ACN

Liite 2. Työohje EVO C18 ja 0,1 % TFA : 0,1 % TFA ACN

Liite 3. Gradientin etsintä EVO C18-kolonnilla

Liite 4. X Bridge-kolonneilla ja isokraattisen ajon tuloksia

Liite 5. Kinetex HILIC SILICA:n eri gradienttia

Lyhenteet

ACN	Asetonitrili. Käyteään myös lyhennettä MeCN.
AH	Aminohappo.
ArF	Argonfluoridi.
BaF	Bariumfluoridi.
CHCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. α -syaani-4-hydroksikanelihappo.
CV	Column Volume. Kolonnin tilavuus, partikkeleiden välinen tilavuus, jonka liikkuva faasi täyttää.
DHB	2,3-Dihydroxybenzoic acid. 2,3-dihydroksibentsoehappo.
2,5-DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid. 2,5-dihydroksibentsoehappo
2,6-DHB	2,6-Dihydroxybenzoic acid. 2,6-dihydroksibentsoehappo.
DNA	Deoxyribonucleic acid. Deoksiribonukleiinihappo. Nukleiinihappoketju, joka sisältää yksilön kaiken geneettisen materiaalin.
Er:YAG	Erbium: Yttrium aluminium garnet laser. Erbium: yttrium alumiini granaatti laseri. Yttrium-alumiini-granaattikide joka on kastettu erbiumiin.
ESI/MS	Electro Spray Ionisation Mass spectrometry. Sähkösumutusionisatiomassaspektrometri.
eV	Elektronivoltti (SI-järjestelmä), energian yksikkö jota käytetään atomi- ja ydinfysiikassa. $1 \text{ eV} = 1,602176565 \cdot 10^{-19} \text{ J}$.
fplc	fast protein liquid chromatography. Nopea proteiininestekromatografia.

GE	General Electric. Yhtiö joka valmistaa analyysilaitteita. Pharmacia LKB on yritysfuusioiden kautta yhdistynyt GE:hen.
HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. α -syaani-4-hydroksikanelihappo.
Hg	Elohopea.
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography. Hydrofoobinen vuorovaikutuskromatografia.
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Hydrofiillisen vuorovaikutuksen nestekromatografia.
HiTrap	Ionivaihtokromatografian kolonni jolla saadaan haluttu analyytti erotettua.
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
IBM	International Business Machine Corporation. Amerikkalainen teknologia ja konsulttiyritys joka on valmistanut mm.+ tietokoneita.
IMAC	Immobilized-Metal Affinity Chromatography. Metalli-ioniin sitoutuva affiniteettikromatografia. Metalli-ioni sitoo itseensä eristettävän proteiinin tai antigeenin jolloin tämän eristys on tehokasta.
IPP	Isoleusyyliprolyyliproliini.
IR	Infrared. Infrapuna säteily. Aallonpituudet 700 nm-1 mm (1050 nm).
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry. Kansainvälinen teoreettiseen ja sovelletun kemian liitto. Liiton tehtävä on standardisoida kemian sanastoa ja mittausmenetelmiä.
SFC	Supercritical-Fluid Chromatography. Ylikriittinen kromatografia. Käytetään liikkuvana faasina ylikriittisiä fluideja jotka ovat kaasun ja nesteen väli- muotoja.

kV	kilovoltti. Jännitteen mittayksikkö, SI-järjestelmän mittayksikkö.
LPP	Leusyyliprolyyliproliini.
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization. Matriisiavusteisesta laser-desorptioionisaatio.
MCP	Micro Chanel Plate. Mikrokanavalevy.
MS/MS	Tandem Massaspektrometri. Kaksi peräkkäin liitettyä massaspektrometriä.
MW	Molecular Weight. Molekyyliainepaino.
N ₂	Typpikaasu.
Nd:YAG	Neodymium: yttrium aluminum garnet laser. Neodymium: yttrium alumiini granaatti laseri. Yttrium-alumiini-granaattikide joka on kastettu neodymiumiin.
ODS	Octadecylsilanol. Oktadekyylisilanol eli C18-kolonne. Silanoliin sidottu alifaattinen 18 hiilen pituinen hiilivety.
OS/2	Operating System/2. IBM:n ja Microsoftin yhteistyössä kehittänyt käyttöjärjestelmä 1980-luvun loppupuolella.
PepT 1	Peptide transporter 1. Peptidikuljettaja 1. Epiteelinen membraani proteiini, jonka tehtävänä on kuljettaa di- ja tripeptidejä.
pK _a	happovakio.
RNA	Ribonucleic Acid. Ribonukleiinihappo. Vastaa soluissa tapahtuvasta mm. proteiinisynteesistä.
RPLC	Reverse Phase Liquid chromatography. Käänteisfaasinestekromatografia.
SA	Sinapic acid. Sinapiinihappo.

SFE	Super Critical Fluid Extraction. Ylikriittinen uutto.
TOF	Time of flight. Lentoaikamassaspektrometri.
Torr	Paineen mittayksikkö. 1 Torr = 133,3 Pa.
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography. Ultrakorkeapainenestekromatografia.
UV	Ultraviolet light. Ultraviolettisäteily. Aallonpituus 10-400 nm. Kemiassa käytettävät detektorit toimivat 400-190 nm.
UV/VIS	Ultraviolet/Visible light. Ultravioletti/näkyvä säteily. Detektori joka havaitsee sekä ultravioletin että näkyvän valon spektrin aallonpituudet 190-700 nm.
VPP	Valyylipropyylipoliini.
XeCl	Ksenonkloridi.
ZnSe	Sinkkiseleenini.

1 Johdanto

Helsingin yliopiston Medicumin Kliinisen Proteomiikan yksikössä tehdään proteiinien ekspressiota, tunnistusta, sekvensointia, kvantitointia sekä karakterisointia kliinisestä näkökulmasta. Yksikkö tuottaa myös kyseiset tuotteet analyysipalveluna. Proteiinit muokkautuvat solun tarpeiden mukaan. Solun eri proteiinien ekspressoituminen solun eri kehitysvaiheessa, solun tarpeiden mukaan. Farmakologian osaston Professori Riitta Korpelan (FT) ja hänen tutkimusryhmänsä on pitkään tutkinut ruoka-aineiden vaikutusta terveyden edistäjinä. Tripeptidi kuuluu hänen ryhmänsä väitöskirjatekijän Anu Siltarin tutkimusaiheisiin.

Työssä pyrittiin kehittämään nestekromatografisia menetelmiä kokeilemalla eri korkeanerotuskyvynestekromatografia (HPLC)-kolonneja, jotta voidaan määrittää tripeptidi isoleusyyliprolyyliproliinin (IPP:n) pitoisuus näytteistä. Toimivista kolonneista kehitettiin menetelmiä ja pyrittiin mahdollisuuksien mukaan optimoimaan kyseinen menetelmä. Paras kolonni ja ohjelma otetaan käyttöön tutkimuksessa. Peptidin eluointi varmistettiin vielä analysoimalla joitain fraktioita matriisiavustetusta-laserdesorptioionisaatiolla (MALDI:lla) ja sähkösumuionisaatio-massaspektrometrin (ESI/MS:n) avulla.

IPP:llä ja muilla samankaltaisilla peptideillä on verisuonia relaxoivia ja joustavuutta lisääviä ominaisuuksia. Fermentoitu maito sisältää näitä lyhyitä di- ja tripeptidejä, jotka aktiivisesti inhiboivat angiotensiiniä muokkaavan entsyymin toimintaa verisuonien seinämien soluissa. Kokeessa vietiin kolme tripeptidiä, IPP, LPP ja VPP, sian verenkiertoon ja mitattiin näiden puolittumisaikaa verenkierron. Sama koe toistettiin viemällä tripeptidejä vatsalaukuun ja mittaamalla tripeptidin imeytymistä verenkiertoon. Imeytyminen oli erittäin nopeaa ja tripeptidit olivat jo vajaassa puolessa tunnissa alle määrittäysrajan. [1, s. 2196-2199.]

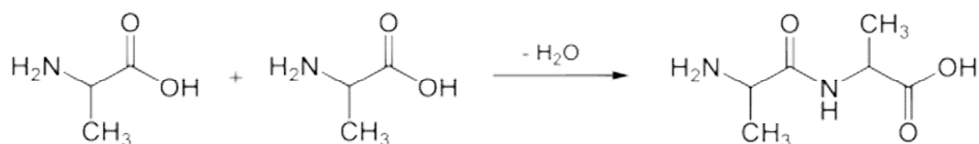
Näytteet on kerätty *in vitro* -kokeista, jossa on käytetty Ussingin laitetta mimikoimaan peptidin imeytymistä ohutsuolessa parasellulaarisesti, mutta myös PepT1-kuljettajat osallistuvat imeytymiseen. Viime vuosikymmenen aikana on huomattu, ettei proteiinien pilkkoutumien kokonaan yksittäisiksi aminohapoiksi asti tapahdu suolistossa vaan suolesta imeytyy tri- ja dipeptidejä. [2, s. 1151-1152.]

In vivo -kokeissa on seurattu peptidin imeytymistä jejumin kalvon läpi ns. suolesta verenkiertoon, vaikutuksia fysiologisin mittauksin. *In vitro* -koe suoritettiin Ussingin laitteella, jossa kaksi kyvetiä ovat kytkettynä toisiinsa ohuen kalvon eli suolen läpi, josta tapahtuu aineensiirto kyvettien välillä. Kyvettien väliin lisättiin litteä tefloninen kasetti, johon oli pingotettu rotan jejumi. Kasetissa olevaan suoleen lisättiin sähkövirtaa eliminoidaan osmoottisia sekä hydrostaattisia gradientteja. Kyvetteihin voitiin tarvittaessa lisätä hapetusta ym. apikaalinen (suolen sisäinen puoli) on alkukammiota päin ja basolateraallinen (verenkiertoon päin oleva suolen puoli) kohti keräyskammiota. Tutkittava aine kulkeutuu suolen apikaaliselta puolelta, sekä solujen välistä että porttien kautta basolateraalille puolelle, jonka kyvetistä on otettu eri aikavälein alikvootit. Peptidiä on lisätty 1 mM (millimolaarinen) Ringer-pitoiseen nesteeseen alkukammiossa, josta se pingotetun suolikalvon läpi siirtyy toiseen kammioon, jossa oli samaa konsentraatiota Ringer-liuosta. Tästä kammioista on otettu alikvootteja, määrätyn aikavälein, tarkoituksena määrittää läpäisyyden kuluva aika ja läpi tulleen peptidin määrääjän funktiona. [2, s. 1151-1157.]

2 Tripeptidi IPP:n rakenne

2.1 Peptidin yleinen rakenne

Proteiinin primäärinen rakenne koostuu toisiinsa liittyneistä aminohapoista. Aminohapon liittyessä toiseen aminohappoon kovalenttisella sidoksella saadaan dipeptidi ja sidoksesta lohkeaa vettä. Lyhyet proteiiniketjut, jotka koostuvat alle parinkymmenen aminohapon ketjuista luetaan peptideihin, tätä pidemmät nimetään proteiineiksi. Kaikkien aminohappojen perusrakenne on sama: α -hiileen (alfa-) on liittynyt aminoryhmä, vety, karboksyyli-ryhmä, sekä sivuketju. Aminohapot eroavat toisistaan sivuketjuns avulla. Peptidisidos muodostuu ensimmäisen aminohapon karboksyyli-ryhmän ($-\text{COOH}$) hiilen ja toisen aminohapon amiini-ryhmän ($-\text{NH}_2$) typen välille (kuva 1). Aminohapot lyhennetään usein kolmikirjaimiksi lyhenteiksi kaavioissa ja kuvissa, tietokannoissa yksikirjaimisina. Proteiinit koostuvat tuhansista, jopa sadoistatuhansista aminohaposta, joten rakenteen tallentaminen yksikirjaisena tietueena on järkevää lyhenteet taulukoituina taulukko 1. [3, s. 22-27.]



Kuva 1. Kaksi aminohappoa liittyy toisiinsa ja lohkeaa vettä, peptidisidoksen synty. [4.]

Taulukko 1. 20 yleisimmän aminohapon nimet, aminohaposta käytetty kolmikirjaiminen, että yksikirjaiminen lyhenne. [5.; 6, s. 220.]

Aminohappo	3-kirjaiminen lyhenne	1-kirjaiminen lyhenne
Glysiini	Gly	G
Alaniini	Ala	A
Valiini	Val	V
Leusiini	Leu	L
Isoleusiini	Ile	I
Prolini	Pro	P
Fenyyialaniini	Phe	F
Tyrosiini	Tyr	Y
Tryptofaani	Trp	W
Seriini	Ser	S
Treoniini	Thr	T
Kysteiini	Cys	C
Metioniini	Met	M
Arginiini	Arg	R
Histidiini	His	H
Lysiini	Lys	K
Asparagiinihappo	Asp	D
Glutamiinihappo	Glu	E
Asparagiini	Asn	N
Glutamiini	Gln	Q

Tutkittavan isoleusyyliprolyliproliinin tripeptidin rakenne koostuu kolmesta toisiinsa liittyneestä aminohaposta: isoleusiinista ja kahdesta proliinista, yksikirjaisena tietueena IPP. Rakenne voidaan kirjoittaa auki seuraavaksi H-Ile-Pro-Pro-OH.

2.2 Ominaisuudet

Molemmat aminohapot, sekä isoleusiini että proliini ovat hydrofobisia, ei-polaarisia aminohappoja. Isoleusiinillä on neljän hiilen pitkä alifaattinen sivuketju, joka luokitellaan poolittomaksi ja hydrofobiseksi. [3, s. 27.]

Muutaman aminohapon pituisten peptidien voidaan olettaa ottavan globularisen muodon. Peptidiketjun kasvaessa, muodostavat aminohapot joustavan kierteen, ja ketjun ylittäessä kahdenkymmenen aminohapon alkavat peptidin sisäiset disulfidisillat muodostua ja muoto vakiintua. Ei-polaariset kohdat alkavat kiertää peptidiä kierteelle ja stabiloivat peptidin. [6, s. 220-222.]

Aminohapot absorboivat eri aallonpituuksilla, lähinnä ultraviolettialueella 190-360 nm (nanometriä). Aminohapossa esiintyvä aromaattinen rengas absorboi voimakkaimmin 280 nm, jota on aminohapoissa tyrosiini, tryptofaani ja fenyyialaniini. [7, s. 56.]

Toinen käytetty aallonpituus on 214 nm, niin sanottu peptidisidos. Peptidisidoksessa tapahtuvan hiilen π - π^* elektronin delokalisaatio hiilen, typen ja hapen välille saa aikaan absorbanssin UV-alueella 180-220 nm välillä. Tämän sidoksen absorptio on voimakkaampi lyhyissä peptideissä ja peptidiketjun kasvaessa pituutta, absorbanssi heikkenee. [8, s. 5445-5446.]

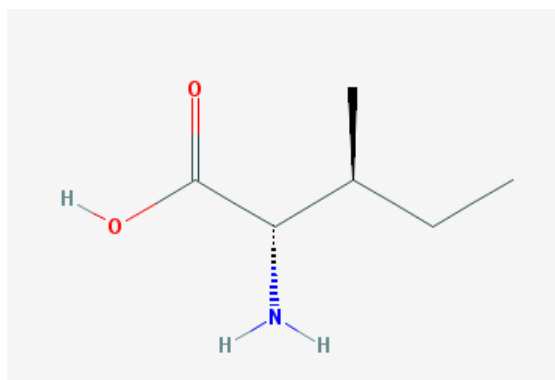
Proliinin paikka peptidissä vaikuttaa peptidisidoksen molaarisen absorbanssin (ϵ) voimakkuuteen. Proliinin ollessa N-terminaalisisena tämä sidoksen absorbanssi on heikko. Proliinin ollessa C-terminaalisisessa positiossa tai keskellä peptidiä absorbanssi on voimakkaampi. [8, s. 5447-5448.]

Peptidit analysoidaan yleensä happamissa olosuhteissa, eluentin pH alle 3. Lievästi emäksisessä eluentissa (pH 8) saatiin myös neutraaleja peptidejä eluoitumaan sekä eluoituvat piikit olivat kapeampia kuin happamissa oloissa. Toisaalta hyvin emäksinen eluentti toimii, koska N-terminaalinen ryhmä on neutraali pH:n ollessa 10. Happamissa oloissa N-terminaalien pää vaikuttaa pariin seuraavaan aminohappoon lisäten näiden hydrofobisuutta. Biomolekyylien erotus onnistuu parhaiten käänteisfaasinestekromatografiamenetelmällä (RPLC), hyvin tuloksiin pääsee myös ionivaihtomenetelmällä (IC) ja hydrofobisella vuorovaikutuskromatografialla (HILIC). Trifluorietikkahappo (TFA) eluentin pH:n säätelijänä on paljon käytetty, pH on riittävän hapan, jotta peptidin N-terminalinen ja sivuketjut lysiini, histidiini ja arginiini ovat positiivisesti varautuneet. Samassa pH:ssa C-terminaalinen karboksyyli-ryhmä, aspargiini sekä glutamiini ovat neutraalit. Tällöin eluointi tapahtuu täydellisesti HIC:in avulla. [9, s. 183; 10, s. 3767-3770; 11, s. 8762-8765.]

2.2.1 Isoleusiini

Isoleusiini on ominaisuuksistaan pooliton, hydrofobinen, ja sen sivuketju on alifaattinen (kuva 2).

- (2S, 3S)-2-amino-3-methylpentanoic acid. (UIPAC)
- MW: 131,17292 g/mol.
- $C_6H_{13}NO_2$ [12.]

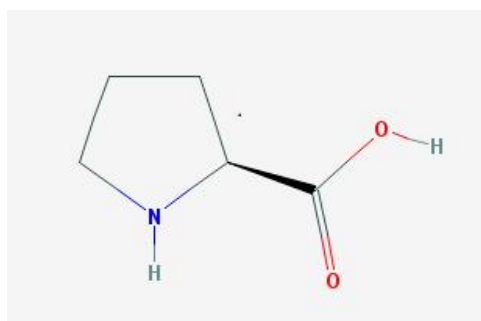


Kuva 2. (L-) Isoleusiinin hiilirunkorakenne. [13.]

2.2.2 Proliini

Proliini on ominaisuuksiltaan pooliton, hydrofobinen ja sisältää pyridiinirenkaan, jossa on peptidisidos (kuva 3).

- (2S)-pyrrolidine-2-carboxylic acid. (IUPAC)
- $C_5H_9NO_2$
- MW: 115,13046 g/mol [14.]



Kuva 3. (L-) Proliin hiilirunkorakenne. [15.]

3 Nestekromatografia

3.1 Yleistä

Nestekromatografialla voidaan analysoida rajaton määrä erilaisia analyyttejä. Ainoa kriteeri on analyytin liukeneminen nesteeseen. Nestekromatografiassa yhdisteiden erottuminen kolonnissa perustuu aktiiviseen massansiirtoon liikkuvan ja kiinteän faasin välillä. Erottuminen etenee poolisuuden mukaan, siten että kolonnista eniten eroavaisuuksia omaava yhdiste erottuu ensiksi, koska vuorovaikutus kolonnimatriisiin ei ole vahva. Resoluutioon ja analyysiaikaan vaikuttavat kolonnin pituus, sisähalkaisija sekä partikkeleiden koko. Kolonni valitaan siten, että poolisille yhdisteille valitaan pooliton kolonni ja päinvastoin. Erottumista säädelään liikkuvan faasin poolisuudella ja liikkuvan faasin komponentteja muuttamalla, eli gradienttiajolla. Siinä tapauksessa, että kyseinen liuotin häiritsee detektointia tai että detektointi ei onnistu, voidaan kerätä fraktiot ja suorittaa määrittäminen jälkikäteen toisilla/muilla analysointilaitteilla. Liuotin valitaan tutkittavan näytteen ominaisuuksien mukaan, poolisille poolinen ja vastaavasti poolittomille pooliton liuotin. [7, s. 153-162; 9, s. 186-187; 16, s. 595-611; 17, s. 8-10.]

3.2 Liikkuva faasi

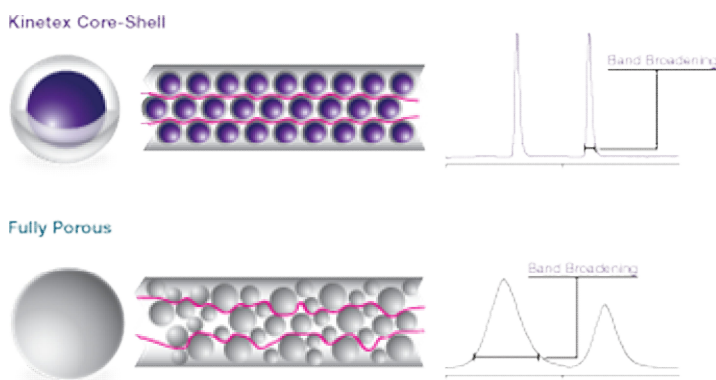
Liikkuva faasi on nestemäinen, käytettävän menetelmän mukainen, poolinen tai pooliton. Ajoliuos on vesi- tai orgaanien liuos tai niiden sekoitus, jonka ionivahvuutta ja pH:ta on säädetty suolalla, hapolla tai emäksellä. Paras puskurin puskurointikapasiteetti saadaan aikaan käyttämällä puskurina käytettävän aineen pK_a :n $\pm 1,0$ yksikön sisällä. Tällöin saadaan ajoliuokselle paras puskurointikapasiteetti ja orgaanisen liuottimen ja näytteiden vaihtelut eivät vaikuta suuremmin retentioon. Ionivahvuutta säätelämällä saadaan säädettyä analyytin retentiota. Puskuriliuoksen ionivahvuus on suotava olla 10-50 mM, tätä korkeampi suolavahvuus voi aiheuttaa eluentin kiteytymistä laitteen putkistoon orgaanisen eluentin pitoisuuden lisääntyessä. Toisaalta alle 10 mM:n ionivahvuudet eivät lisää eluointi tehokkuutta. Eluentin pH säädetään ja tarkistetaan pH-mittarilla ennen lisäystä orgaaniseen eluettiin. [7, s. 160-162; 9, s. 187; 17, s. 12-14.]

Käänteisfaasikromatografiassa liikkuva faasi on poolisempi kuin kolonnin kiinteäfaasi, joka on pooliton, esimerkkinä oktadekyylisilanoli (ODS). Normaalifaasikromatografiassa

päinvastainen eli pooliton orgaaninen liuotin koska stationäärifaasi on vahvasti poolinen kuten silika tai alumiini. [7, s. 155; 9, s.167.]

3.3 Stationäärifaasi

Stationäärifaasin on oltava stabiili, vakaa ja inertti. Partikkelin koko ja muoto vaikuttaa analyttien erottumiseen. Kolonnin sisähalkaisija, partikkelin koko ja huokoisuus vaikuttavat laitteistossa muodostuvaan paineeseen. Partikkelin rakenne voi olla erilainen, kiinteälle partikkelin pinnalle sidottu aktiivinen faasi (bonded phase), pellikulaarinen (pellicular) eli kiinteään partikkelin pinnalla on aktiivinen huokoinen faasi, huokoinen (porous) ja täysin huokoinen (perfusion). Muoto voi olla epäsäännöllinen, pyöreä tai tankomainen. Pyöreän ja tasakokoisen partikkelin voidaan parhaiten pakata tiiviiksi, jolloin saadaan paras erotuskyky ilman ylimääräistä vyöhykkeen leviämistä. Partikkelin pintaan voidaan kemiallisesti sitoa aktiivinen faasi esimerkiksi silikaa, polymeeriä tai hiukkasista koostuva verkko. Huokoisen tai täysin huokoisen partikkelin koloihin kulkeutuu liikkuvassa faasissa oleva analytti (kuva 4). Yleisin käytetty partikkeli HPLC:ssä on silika, jonka vapaisiin hydroksiryhmiin sidotaan kemiallisesti sopiva matriisi eli modifioidaan faasia. Mitä pienempi partikkelikoko, sen parempi erotus saadaan aikaan. [9, s. 145-156.]



Kuva 4. Kiinteä ydin ja ohut stationäärifaasi saa aikaan tehokkaan massansiirron ja pitkittäisdiffuusion huomattavan pienemisen. [18.]

Aktiivinen pinta-ala on massansiirrossa tärkeätä. Mitä suurempi pinta-ala, sitä parempi ja tehokkaampi on erottuminen. Kinetexin Core Shell-kolonnit ovat pellikulaarisia ja pinnalle sidottu ohut kerros faasia 1-3 μm (mikrometri), jossa tapahtuu massansiirto eli erottuminen tapahtuu (kuva 4). Kiinteä ydin ja ohut aktiivinen pintakerros kolonnin par-

tikkelissä saa aikaan tehokaan erottumisen sekä pitää kolonnin paineen pienenä. Tämä antaa myös mahdollisuuden käyttää pidempää kolonnia ja pienempää partikkelikokoa. [18.]

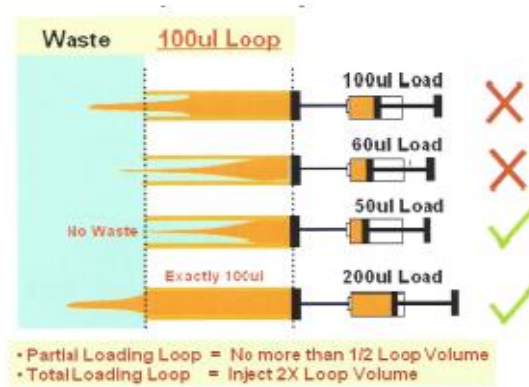
Hyvin huokoisessa partikkelissa on pienellä pinta-alalla suuri aktiivinen pinta-ala tehokkaalle massansiirrolle. Tämä mahdollistaa lyhyet kolonnit, mutta huokoisuus aiheuttaa suurenvastapaineen kolonniin ja sitä kautta systeemiin eli käytössä on silloin UHPLC. [9, s. 145-156.]

3.4 Näytteen syöttö

Näyte injektoidaan eli lisätään systeemiin ruiskun avulla näytteen syöttötilaan eli näytesilmukkaan. Näytesilmukoiden volyymia voi helposti muuttaa, proteiinitöissä silmukan koko voi olla jopa 50 ml. Näytesilmukat voidaan vaihtaa helposti toisen kokoisiksi. Silmukasta venttiili aukeaa ja näyte siirtyy eluentin mukana systeemiin. Nestekromatografiassa liuotinsysteemi on suljetussa tilassa, venttiilien takana, koska systeemissä on korkea paine, jonka on pysyttävä stabiilina. Näytteen syöttö tapahtuu joko manuaalisesti tai automatisoituna. Venttiili aukeaa ja näyte siirtyy kromatografialaitteistoon liikkuvan faasin mukana. Näytteen syöttö on suurimmaksi osaksi automatisoitu tänä päivänä, jolloin hyödynnetään koko vuorokausi näytteiden analysointiin. [9, s. 141-142.]

Näytesilmukan täyttö on tehtävä oikein, jotta saadaan oikea määrä näytettä kolonniin sekä luotettava tulos (kuva 5).

- Huuhtelee silmukka kaksinkertaisella silmukan määrällä puskuria ennen näytteen latausta.
- Älä täytä näytesilmukkaa kuin korkeintaan puolet silmukan tilavuudesta TAI ylitäytä silmukka kaksinkertaisella määrällä näytettä. Ylimäärä näytettä valuu jätejohtoon kautta jätteisiin.
- Älä poista ruiskua injektorista näytteen injektoinnin jälkeen, koska näytesilmukalla on yhteys jätejohtoon ja näyte valuu pois jos ruisku poistetaan.
- Jotta näyte siirtyisi kokonaan kolonniin, näytesilmukan tulee huuhtoa kaksinkertaisella määrällä eluenttia kuin silmukan volyymi on. [19, s. 19-20.]

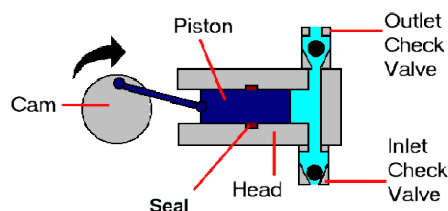


Kuva 5. Havainnekuva näytesilmukan oikeasta täytöstä. [20, s. 91.]

3.5 Pumput

Yleisimmät pumpput ovat ruisku-, resiprookki- ja pneumaattiset pumpput. Seuraavaksi käsitellään syvemmin kahta ensiksi mainittua. Pumppujen on pystyttävä liikuttamaan nestemäistä faasia pulssittomasti ja tasaisesti ja toteuttava tämä joskus hyvinkin korkeassa paineessa. Pneumaattisten pumppujen mäntää työntää paineilma, jolloin saadaan käyttöön korkea virtausnopeus. Pumppujen heikkona kohtana on virtausnopeuden säätö sekä liuottimien vaihto gradientiajon yhteydessä. Pneumaattisten pumppujen laajin käyttöalue on kolonnien täytössä. [9, s. 140.]

3.5.1 Ruiskupumput

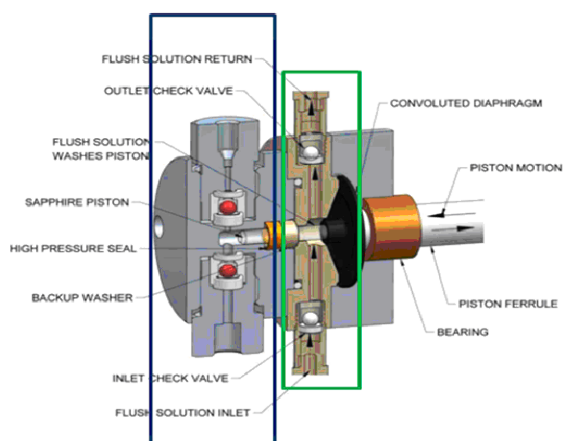


Kuva 6. Ruiskupumpun kaaviokuva. Pistoni työntää eluentia tasaisella paineella askelmoottorin määrittäessä nopeutta. Palloventtiilit säätävät eluutin liikkumista vain toivottavaan suuntaan. [21.]

Ruiskupumppu mahdollistaa tasaisen virtauksen ja tarvittaessa hyvin korkeita paineita. Askelmoottori työntää mäntää, joka säädetään muuttamalla moottorin jännitettä (kuva

6). Käytetään yleensä mikro-HPLC ja kapillaari-SFC ja SFE-laitteisiin, laajaa käyttöä rajaa liuotinsäiliön rajallinen tilavuus, koska ajon aikana on mahdotonta täyttää säiliö uudestaan. Muutamiin laitteisiin voidaan vaihtaa liuotinsäiliön koko. Hyvänä puolena on, että tällä laitteella voidaan saada aikaan hyvin pieniä virtausnopeuksia. Gradient-tiajot onnistuvat myös niin kauan kun ajoon tarvittavat eluenttien määrät mahtuvat eluenttisäiliön tilavuuteen. Tätä varten on laskettava ajoon tarvittavat eluenttien määrät, useimmissa laitteissa tämä on huomioitu jo ohjelmoinnissa. [9, s. 140.]

3.5.2 Resiprookkipumput



Kuva 7. Resiprookkipumpun poikkileikkaus. Sinisellä rajattu se pumppuosa johon pumpun safiirinen pistoni pumpppaa eluentia, joka menee kolonniin, palloventtiilin pallot punaisena. Vihreällä rajattu on huuhteluliuksen osa pumpusta, josta pistoni kulkee lävitse, huuhteluliuksen kulkua säätelevät myös palloventtiilit. Kuvan musta osa on membraanikalvo. [22.]

Resiprookkipumput ovat yleisin käytössä oleva pumppumalli (kuva 7). Eluentti on erillisessä säiliössä, josta se imetään pumppuun. Tämä mahdollistaa siten jatkuvan työskentelyyn, korkeammat paineet, sekä laajemman gradienttiajon. Moottori liikuttaa mäntää edestakaisin hydraulisessa kammiossa. Liikkuessaan taaksepäin mäntä imee eluenttia ja kolonniin menevä venttiili on kiinni. Työntyessään eteenpäin mäntä pump-paa eluenttia systeemiin ja eluenttisäiliöön oleva palloventtiili on vastaavasti suljettu. Tämä aiheuttaa pulssin, joten yleensä pumput ovat pareittain, jolloin vaimentavat tois-tensa pulssit ja näin saadaan tuotettua pulssitonta virtausta. Membraanipumppu koos-tuu kahdesta lomittain toimivasta pumpusta (kuvat 7 ja 8), joiden liikkeet kumoavat yh-destä pumpusta syntyvän pulssin pulssittomaksi. [7, s.163-164; 9, s. 138-139.]

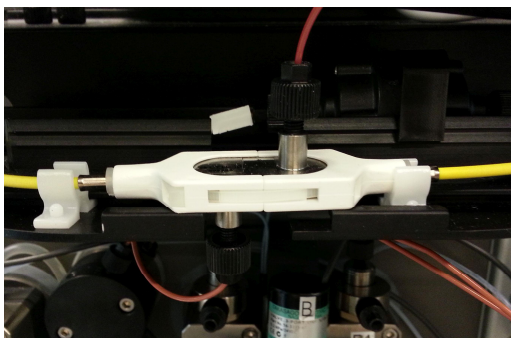


Kuva 8. ÄKTApurifier10:n yhden resiprookkipumpun osat. Ylävasemmalla ovat pumpun jousi ja safiiripistoni (mäntä), keskellä huuhteluosan diafragmakalvo ja alavasemmalla itse metallinen eluenttipumppu. Kuvassa on yhden pumpun osat leviteltynä pumppujen huollon yhteydessä laitteen neljästä pumpusta.

3.6 Detektori

Nestekromatografiassa detektori voi olla lähes mikä tahansa. Yleisimmin on käytetty spektrofotometrisiä detektoreita. UV/VIS -detektorilla on hyvä laaja käyttöalue sekä lineaarisuusalue, ja se soveltuu hyvin gradienttijaon (kuva 9). Eluenttia valittaessa on huomioitava, että tietyt liuottimet eivät sovellu eluenteiksi aina, koska absorboivat tiettyjä aallonpituuksia ja aiheuttavat näin korkean taustasignaalin. Analyytin absorptiomaksimi on hyvä selvittää, jolloin voidaan valita paras analyysiaallonpituus. Diodirividetektorilla voidaan mitata useita aallonpituuksia yhtä aikaa. [9, s. 156-160; 17, s 16-17.]

Nestekromatografialaitteiston jatkeeksi voi liittää vaikka liekki-ionisaattorin, yleisimmin liitettynä on massaspektrometri. Nestekromatografian yleisdetektori on taitekerroindetektor, joka mittaa liikkuvassa faasissa tapahtuvan muutoksen eluutin taitekertoimessa. Taitedetektor ei sovi gradienttijaoihin, jolloin liikkuvan faasin taitekerroin muuttuu analyysiajan aikana. Muita mittareita on esimerkiksi johtokyky-, pH-, fluoresenssi- ja infrapunadetektorit vain muutamia mainitakseni. [9, s. 156-160.]



Kuva 9. GE ÄKTApurifier 10 laitteiston läpivirtauskyvetti Flow Cell. Kyvetiin tulee ylhäältä punaista putkea pitkin liikkuvaa faasia ja poistuu kyvetin alaosasta. Keltaiset johdot ovat valokaapelit jotka siirtävät kyvetin läpi kulkevan valon signaalia.

4 Massaspektrometrit ESI (electrospray ionization) ja TOF (time-of-flight)

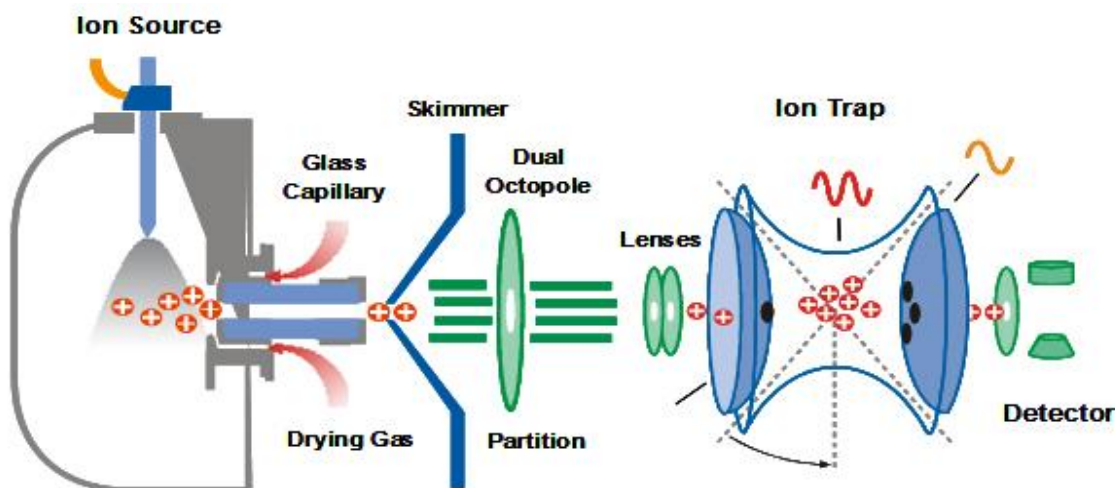
4.1 Massaspektrometri ESI (ioniloukku)

Kaasu- tai nestekromatografian perään voidaan liittää massaspektrometri analyyttien tarkempaa analyysiä varten, mutta laitteeseen voidaan injektoida myös suoraan ilman kromatografialaitteistoa. Näyte siirtyy massaspektrometriin ionisointikammion kautta.

Nestemäinen näyte siirtyy ensiksi näytteesyöttäjästä ionisaattoriin muuttaen analyytin ioneiksi. Näytteesyöttäjä on kapea silikasta tehty kapillaari, joka on ympyröity teräksellä, nesteen virtausnopeus on sopivimmin 2-200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Näytekapillaarin ulostulon aukon ympärillä on metallinen elektrodi, johon kytketään vahva sähköinen jännite n. 3-4 kV. Kapea sähköistetty suutin ja normaali ilmanpaine saavat aikaan näytteen hajoamisen hienoksi varautuneeksi aerosoliksi. Kapilaariin syötettävä jännitteen varaus muutetaan sopimaan analyysiä. Elektrodiin syötetään negatiivinen varaus kun halutaan tutkia negatiivisesti varautuneita ioneita ja päinvastoin. Negatiivisten ioneita tutkiessa elektrodissa on negatiivinen jännite, jolloin positiiviset ionit pysyvät kapillaarin seinämillä ja syntyvän aerosolin hiukkaset ovat negatiivisesti varautuneita. [9, s. 43-44; 17, s. 98-106.]

Muodostuneet pisarat saavat sähköisen varauksen sähkökentässä. Varaukselliset pisarat pienenevät edelleen kuivuessaan lämmön ja kuivauskaasun avulla. Liuottimen haihtuessa varaus kasvaa, kunnes varauksen suuruudesta hajoaa pienemmiksi pisaroiksi ja kaasufaasissa oleviksi ioneiksi. Kuivuessaan eluentista ionisoituneet analyytit

siirtyvät normaalissa ilmanpaineessa kammioon virtaavassa inertissä kaasussa, yleensä typpeä, siirtyessään kohti ohjauslevyä (kuva 10). Muodostuneet partikkelit jatkavat matkaansa repellerlevyjen ja ohjauslinssisysteemin kautta, kahden eri alipaineistetun vyöhykkeen läpi, jossa vyöhyke yksi on 2-10 Torr ja vyöhyke kaksi 1,0-0,1 Torr, vakuimitilassa olevaan massaspektrometriin (kuva 10). [9, s. 42-44; 17, s. 40-51, 98-106.]



Kuva 10. Bruker Esquire 6000 kaaviokuva. Ionilähde suihkuttaa näytteen hienona sumuna. Inertti kaasuvirta saa pisarat kuivumaan. Kuivat ionisoidut molekyylit ohjautuvat linssien ja magnetisoitujen repellerlevyjen läpi ioniloukkuu. Ioniloukkussa on rengaselektrodissa korkea radiotaajuusjännite, joka pidättää ioneja päästääkseen ne yksi kerrallaan detektorille. [23.]

Ilmanpaineessa löytyy partikkeleita, johon molekyylit voivat törmätä ja tämä aiheuttaa ongelmia. Tästä syystä massaspektrometrissä on vakuumi. Ionisaatiokammiossa muodostuneet ionit siirtyvät massaerotteluun, jossa on magneettien muodostama vahva sähkökenttä, jotka ohjaavat ionit detektorille. Ionit erottuvat lentorataansa oman molekyylipainonsa ja varauksensa (m/z) mukaan. Kvadrupoli-massaspektrometri on yleisin käytetty magnetointiohjoin. Detektorina massaspektrometrissä on yleensä elektronimoinistin, joka monistaa ionin energian sähköpulsseiksi. Menetelmä on hyvin herkkä, laite pystyy mittaamaan luotettavasti pieniä pitoisuuksia, jopa pg/l. Tutkittava näyte ei saa reagoida käytettävän kantokaasun ja kolonnin molekyyliden kanssa. [9 s. 49-58; 16, s. 502-506, 512-514; 17, s. 122-127.]

4.2 Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio

MALDI tulee sanoista eli matriisiavusteisesta laserdesorptioionisaatiosta. Laserin avulla saadaan ioneja irrotettua biologisesta näytteestä. Ionisaatiota avustaa näytteeseen tai näytteen päälle lisätty orgaanien matriisi. Näyte ja matriisi applikoidaan sopivalle alustalle, joka voi olla teräs tai lasi. Lyhyt, tietyllä aallonpituudella ampuva laserpulsso suunataan näytteeseen, laserista tuleva sähkömagneettinen säteily energisoi matriisin, joka puolestaan ionisoi näytteen molekyylejä. Höyrystyneet ja ionisoituneet molekyylit siirtyvät lentomassaspektrometriin. [7, s. 213.]

Laitteella pystytään menetelmän mukaan analysoimaan 2000 Da:sta (Dalton) aina 500 kDa:n kokoisia molekyylejä. Alle 2000 Da:n kokoisille analyyteille matriisi aiheuttaa lievää häiriötä. Yleinen suhde matriisia suhteessa analyyttiä on 10^{-2} pienille molekyyleille ja suurille 10^{-4} . Tyypillisessä UV-MALDI:n analysoitavassa näytteessä on analyyttiä 10^{-6} M ja matriisiliuos, jonka pitoisuus on lähes kylläinen (0,1 M). Pienet määrät matriisia ja näytettä sekoitetaan ja liuottimen haihduttua näyte voidaan siirtää vakuumiin analysoitavaksi. Tärkeätä on että matriisi on tasaisesti sekoittunut analyytin kanssa ja liuottimen haihduttua muodostaneet pieniä homogeenisiä kiteitä. Eri matriisit vaativat eri aallonpituuksia desorptiolle, ja analyytin koko vaikuttaa matriisin valintaan (Taulukko 2). [24, s. 3-5.]

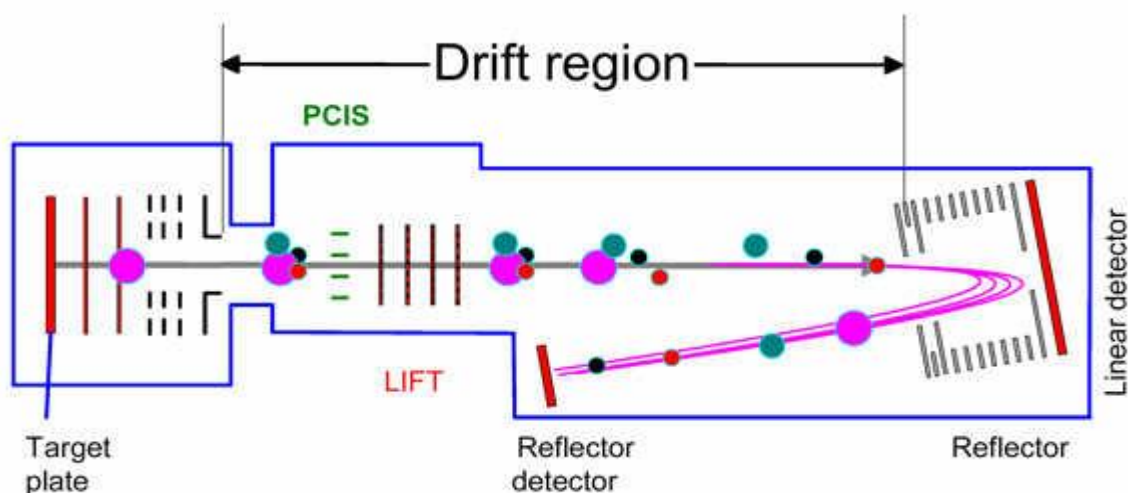
Taulukko 2. Proteiinianalytiikassa eniten käytetyt matriisit MALDI:n kanssa, niiden absorptiomaksimit ja käyttökohteet. [24, s. 19].

Matriisi	Aallonpituus (nm)	Käytetyt applikaatiot
2,5-dihydroksibentsoehappo (2,5-DHB) (2,6-DHB myös)	337, 353 nm (UV)	Proteiinit, peptidit, hiilihydraatit, synteettiset polymeerit
α -syaani-4-hydroksikanelihappo; CHCA tai HCCA	337, 353 nm (UV)	Peptidit, fragmentaatio
Sinapiinihappo; SA	337, 353 nm (UV)	Proteiinit, peptidit
Nikotiinihappo	266 nm (UV)	Proteiinit, peptidit, adduktion muodostus
Meripihkahappo	2,94 μ m, 2,79 μ m (IR)	Proteiinit, peptidit

Matriisin oikea valinta on tärkeä osa analytiikasta. Ei ole olemassa yhtä oikeata universaalista matriisia, jolla kaikki voidaan analysoida. Matriisi on valittava analyytin ja analyysin mukaan. Taulukko 3:ssa on listattu esimerkkejä analyyteistä ja niille sopivat matriisit sekä liuottimet. Yleisiä proteomiikassa käytettyjä matriiseja ja niiden sekoituksista

ovat α -syaani-4-hydroksikanelihappo (CHCA/HCCA), dihydroksibentsoehapot eli DHB:t (2,5-DHB ja 2,6-DHB), nikotiinihappo, sinapiinihappo ym. [24, s. 18-20.]

Laseri pommittaa näytettä noin 100 μ s:n (mikrosekunti) pituisella pulssilla. Pulssi saa-
vuttaa vakuumitilassa olevan analysointilevyn (ancor plate), jossa on applikoituna näyte
ja matriisi. Lisääntynyt energia saa aikaan sumun (plume), josta matriisi ja analyytit
sinkoutuvat levyltä, samalla matriisi kehittää ioneita ja siirtää ne analyylille, joka ionisoi-
tuu. Ankkurilevyn pinta on käsitelty hydrofobiseksi. Levyllä on 100-500 μ m läpimitaltaan
olevia hydrofobisia saarekkeitä, johon applikoidaan näytteet (kuva 16). Laserin energia
imeytyy matriisiin, joka siirtää sen näytteeseen (kuva 11). Analyytin ionit siirtyvät va-
kuumissa analysaattoriin, joka voi olla massaspektrometri (MS) tai lentomassaspekt-
rometri (TOF). [24, s. 7-11, 21-22.]



Kuva 11. MALDI TOF/TOF:n kaavakuva. Kuvassa näkyy ionisoitujen molekyylien kulkema reitti LIFT TOF/TOF-analysaattorissa. Molekyylit analysoidaan kahdesti, valiten prekursorin ja siitä syntyvät fragmentit. [25.]

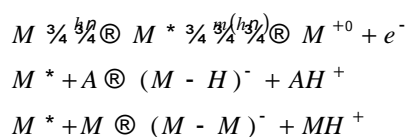
Laserin valonlähde vaikuttaa siihen, millä aallonpituudella analysoidaan. On olemassa UV-alueelta aina IR:ään asti lasereita. MALDI:ssa käytettävät laserit ovat erilaisia, riip-
puen käyttötarkoituksesta ja aallonpituudesta. UV-alueelle voidaan käyttää lasereita
ArF (193 nm), KrF (248 nm), XeCl (308 nm) sekä N₂-lasereita (377 nm), UV- ja näky-
välle valolle Nd:YAG- laseria, sekä IR-alueelle Er:YAG-laseri (2,94 μ m) ja CO₂-
lasereita (10 μ m). Nd:YAG-laseri yhdessä N₂-laserin kanssa ovat yleisimmin käytetyt
UV-alueen lasereista. Pienen kokonsa ja yksinkertaisuutensa sekä suhteellisen edulli-
sen hintansa vuoksi ne ovat suosittuja lasereita. Typpi (N₂) emittoi aallonpituudella 337
nm, joka on lähellä sekä 2,5-DHB:n että HCCA:n absorptiomaksimeja. Kiinteä Nd:YAG-

laseri emittoi 355 nm:ssa kolminkertaisella taajuudella, ja sekä käytetään myös UV-alueen laserina korkean resoluution erotuksessa. IR-alueella tarvitaan aallonpituus, joka emittoi lähellä 3 µm, koska OH- ja NH-sidosten absorptioaallonpituus on lähellä 3 µm. [24, s. 30-32.]

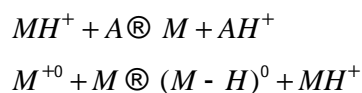
Laserpulssin emissiosäteen leveys vaihtelee käytetystä laserista ja aallonpituudesta, UV-alueella 0,5 -25 ns (nanosekuntia), eniten käytettynä on 3-5 ns ja IR-alueella 5-100 ns. Laserin energia vaihtelee aallonpituuden ja laitteiston mukaan, kuten UV-alueella vaatii 10-100 µJ/pulssi ja IR-alueen puolella 100 µJ-1 mJ. MALDI-MS vaatii vähemmän energiaa kuin edellä mainitut. [24, s. 30-32.]

Laserin säteen fokusointi tapahtuu linssisysteemin kautta ennen näytteelle saapumista. Lasersäteen fokusointi on oltava tarkka, jotta säteestä siirtyy mahdollisimman paljon energiaa näytelevyllä olevaan matriisiin. Linssien materiaali valitaan käytettävän materiaalin mukaan, UV-MALDI:lle linssit ovat UV-säteilyä läpäisevää kvartsia, CO₂-lasereille linssien on oltava BaF tai ZnSe. UV-MALDI:lla ionisaatiossa laserilla käytettävä aallonpituus on 337-355 nm ja fotonien energiat ovat vastaavasti 3,6 sekä 3,3 eV matriisin energisoimiseen. Ionisaatioon vaaditaan ainakin kaksi fotonia matriisiin. Kyseisiä aallonpituuksia käytetään paljon peptidien ja proteiinien analysoimiseen. [24, s. 11; 30-33.]

Primäärisessä ionisaatiossa näkyy matriisin (M) molekyylejä, ovathan ne absorboineet laserin energian. Seuraavaksi näkyy analyytin (A) ioneja. [24, s. 11; 27, s 22.]



Sekundäärinen ionisaatio tapahtuu sumussa. Matriisi ja analyytti reagoivat toistensa kanssa monin eri tavoin. Pääreaktio on kumminkin protoninsiirto. Matriisi reagoi edelleen itsensä kanssa. [24 s. 11; 27, s 22.]

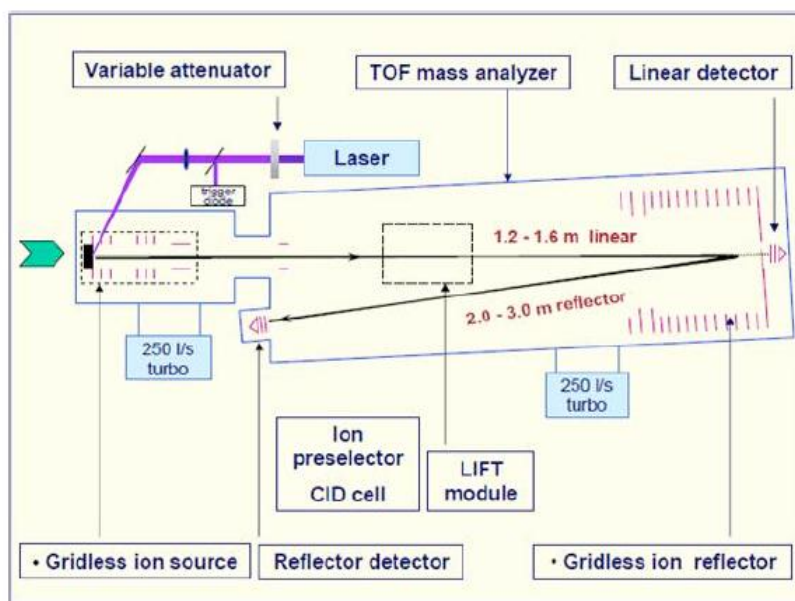


Negatiivinen moodi sopii metaboliittien analysointiin (hiilihydraatit ja fosforiproteiinit), näistä suurin osa analyyseistä ovat heikkoja orgaanisia happoja. [24, s. 11; 27, s. 22.]



Laserin pulssin näytteestä irrottamat ionit lentävät ensiksi deflektorien välistä tyhjiin tilaan, jossa on vakuumi, eli lentotilaan. TOF:ssä on pitkä vakuumi tila, jossa ioneilla on tilaa lentää kohti detektoria. Lentotilan vastakkaisella puolella on detektori, yleisin on mikrokanaalelevy (MCP). Signaali lasketaan yksinkertaisesti lentoon menneen aikaan käyttäen oskilloskooppia. Oskillaattori on säädettävä siten, että se aloittaa skannauksen välittömästi kun ionit on generoitu. Tämä saadaan aikaan jakamalla laserin säde kahtia kuten kaksisädespektrometrissä (kuva 12). Säteestä murto-osa ohjataan suoraan fotodiodille ja valtaosa kulkeutuu näytteelle. [24, s. 41-47.]

MALDI-TOF/TOF:ssa on kaksi erillistä lentotilaa, joiden välissä on törmäyskammio (collision cell). Törmäyskammio muuntaa osan analyytin kineettisen energian sisäiseksi energiaksi fragmentoiden analyytin fragmentit pienemmäksi. Törmäyskammiossa on inerttiä kaasua, yleisimmin on käytetty typpeä. Kammiossa ionit fokusoidaan ja saavat lisää kineettistä energiaa 25-200 eV/viritetty ioni. [24, s. 41-47; 26; 27, s. 23-25.]



Kuva 12. Bruker MALDI LIFT® TOF/TOF:in kaavakuva josta näkee näytteen fragmenttien kulukema matka. [28.]

Toinen yleisesti käytetty tandem-TOF-analysaattori on LIFT® (kuva 12), jossa fragmentit ”nostetaan ylös” lentoaikaosassa. Ensimmäisellä lentoaika-alueella on LIFT® yksikkö, joka antaa ioneille energiaa ja pidentää täten lentoa. Ionit osuvat lineaariselle detektorille, josta ionit heijastuvat toiselle lentoradalleen ja päätyvät reflektorin detektorille. [24, s. 47; 27, s. 32.]

Analyyttistä fragmentoituneilla ioneilla, jotka ovat muodostuneet analyytin ionisoinnin jälkeen, on sama nopeus kuin analysoitavalla ionilla ja saapuvat samanaikaisesti perille LIFT®:iin. Lentotilassa sijaitsee myös ohjain, jonka tehtävänä on rajata pois ei-toivottuja ja häiritseviä ioneja. TIS (Timed Ion Selector) -yksikkö rajaa LIFT®:lle tulevat ionit siten että päästää LIFT®:lle analysoitavan ionin ja rajaa pois matkan aikana muodostuneet epäspesifiset tytärionit. [23, s. 44-47; 27, s. 32.]

Lentotilassa tapahtuu analyytin hajoamista. Molekyylin hajoamisia on kahta erilaista hajoamista:

In Source Decay (ISD). Ionit jotka jäävät pitkäksi aikaan lähteeseen, törmäävät toisiinsa muodostaen näin uusia fragmentteja hajotessaan. Syntyneet fragmentit ovat reagoituaan vedyn kanssa kemiallisia radikaaleja. Näkyvät yleensä heikkona taustakohina, intensiteetti on liian heikkoa jotta ioneista on käytännöllistä hyötyä. [24 s. 44-47; 27, s. 31.]

Post Source Decay (PSD). Muodostuneet ionit saavat ylimääräistä energiaa desorption aikana. Ionit lähtevät lähteestä ehjänä mutta lentotilassa tapahtuu fragmentoitumista. Fragmenteilla on sama nopeus kuin halutulla ionilla mutta kyseisten ionien kineettinen energia on sidottuna näiden massaun. Fragmentit päätyvät eri aikaan, eri kulmassa reflektorille. Ioniporttia käyttäen voidaan valita alkuperäisestä analyytistä peräisin olevat ionit. [24 s. 14-15, 44-47; 27, s 31.]

Puhdistetuille proteiineille sopivat matriisit ja liuottimet ovat erilaisia eri proteiineille (Taulukko 3).

Taulukko 3. Puhdistetuille proteiineille tyypillisesti käytettävät matriisit sekä modifioijat MALDI-MS:n kanssa. [24, s 88.]

Analyytti	Matriisi	Liutin / lisäaineet	Kommentti
Liukoinen proteiini	SA; HCCA; DHB	0,1 % TFA:ta ja 50 % ACN	Kuivattu pisara-applikaatio tai kerrosvoileipäapplikaatio
Hydrofobinen proteiini	HCCA HCCA	Muurahaishappo Etyyliasettaatti	Neste-neste ekstrahointiin hydrofobiset lajikkeet
Glykoproteiinit	DHB; THAP DHAP	0,1 % TFA:ta ja 30 % ACN Diammoniumasettaatti	
Proteiinien sekoitukset	HCCA; DHAP	0,1 % TFA:ta ja 30 % ACN Diammoniumasettaatti	

Peptideille ja pienimille proteiineille (alle 2000 Da:ta) käytetään yleisesti HCCA:ta ja DHB:tä ja liuottimena 0,1 % TFA:ta ja asetonitriliä 30-70 % liuottimen tilavuudesta. Isot proteiinit antavat paremman tuloksen käyttämällä matriisina SA:ta tai DHB:tä lineaarisessa TOF/MS:ssä. Hydrofobiset proteiinit voidaan analysoida HCCA:lla liuotettuna korkeaan pitoisuuteen muurahaishappoa aina 30 %:seen asti. [24, s. 86-89.]

MALDI on hyvin paljon proteomiikassa käytetty analysaattori. Laitteella voidaan analysoida hyvinkin suuria proteiineja, peptidejä, RNA:ta sekä DNA:ta. MALDI/MS:tä käytetään laajasti peptidikartoituksessa. Proteiinit digestoidaan ennen analysointia trypsiinillä ja muilla entsyymeillä. Trypsiini on aktiivinen spesifinen proteaasi, joka pilkkoo C-terminaalista arginiiniä ja lysiiniä, proteiinin 500-5000 Da:n kokoisiksi fragmenteiksi. Käytössä lisäksi endoproteaaseja, kymotrypsiiniä, proteinaasi K ja subtilisiiniä. Jotta saadaan hyvä signaali, proteiinia ei tarvita annosteltuna levyille kuin 1-10 pmol. Peptidi kartoituksessa peptidi-ionit analysoidaan MALDI-MS ja MS/MS, sekä sekvensoinnin avulla ja kootaan lopullisesti primääriseen järjestykseen analysointiohjelman avulla. [24, s. 86-99.]

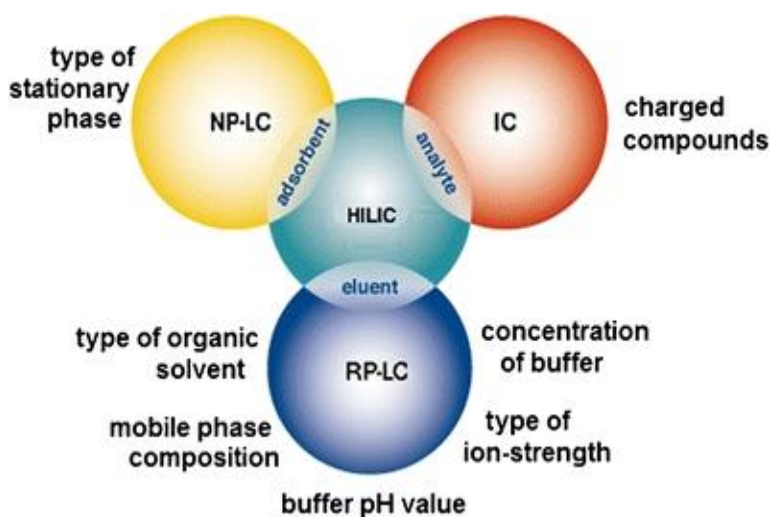
5 Kolonni

Kolonnit koostuvat lasiputkeen pakatuista stationäärifaasista, joka on suojattu teräskuorella. Stationäärifaasi on useimmiten silikaa, jonka päälle on sidottu kiinteä eli stationäärifaasi, muitakin löytyy. Lyhyillä kolonneilla saadaan aikaan nopeampi erottuminen, myös näytteen leviäminen on vähäisempää. Painetta nostaa kolonnin pituus, myös kolonnin kapeus nostaa paineita. Kiinteän faasin partikkelikoko aiheuttaa myös

paineen nousua: mitä pienempi partikkeli sen korkeampi paine. Myös partikkelin huokoisuus nostaa painetta: mitä huokoisempi partikkeli, sitä korkeampi paine. [9, s. 163-190.]

5.1 Hydrofiilisen vuorovaikutuksen kromatografia

HILIC:iä on aikaisemmin laskettu normaalifaasikromatografian muodoksi. Nykyään se on erotettu omaksi kromatografia muodoksi. HILIC:llä voidaan erottaa toisistaan erittäin polaarisia yhdisteitä, jota ei RPLC:llä saada erotettua. Sillä voidaan myös erottaa muista kolonnimatriiseista vaikeasti erottuvia yhdisteitä, jotka muilla kolonneilla eluoituvat lähellä viiveaikaa (t_M), eli analyytti ei pidäyty stationääri faasissa juuri lainkaan. HILIC:in erottelumekanismi on normaalifaasikromatografiaa monimutkaisempaa. Liikkuva faasi HILIC:ssä on normaalikromatografian kaltainen, orgaaninen ja pooliton. HILIC:ssä on myös ionikromatografian (IC) piirteitä. Analyytin retentiota (t_r) heikennetään lisäämällä liikkuvan faasin ionipitoisuutta (kuva 13). Käytettävien suolapuskureiden pitoisuus vaihtelee 10-300 mM:n välillä. Suolaa valittaessa on huomioitava, että käytettävä suola ja sen konsentraatio ei saa aiheuttaa saostua orgaanisessa eluentissa. [29, s. 231, 236-237.]



Kuva 13. Havaintokuva, miten HILIC:ssä yhdistyy kromatografian kolme erilaista vaikutusmekanismia. [29, s. 232.]

Vuorovaikutus tapahtuu kiinteään normaalifaasin, silikan huokosen pintaan kiinnittyneen liikkuvan hydrofiilisen polaarisen faasin, analyytin ja liikkuvan faasin hydrofiilisten voimien välillä. Tärkeintä on, että kolonnin kiinteän faasin molekyylit ovat aina polaarisen

faasin peittäminä. Veden tai poolisen eluentin osuuden vähetessä liikkuvassa faasissa ja asetonitriliin (ACN) lisääntyessä vesi sitoutuu tiukimmin silikaan ja asetonitrili ei pysty reagoimaan silikan kanssa. Asetonitriliin ollessa 30-70 v-% liikkuvassa faasissa silikaan on kiinnittynyt kolme kerrosta vettä ja asetonitriliä. Veden ollessa vähemmän kuin 20 v-% orgaanisessa faasissa, kiinteään faasin on sitoutuneena enemmän vettä kuin on vapaana liikkuvassa faasissa. Kolonnin kiinteän faasin tasapainottuminen tapahtuu hitaammin kuin muut kromatografiassa käytetyt kolonnit, ja tästä syystä polaarista faasia on oltava koko ajan vähintään 2-5 v-% liikkuvassa faasissa. Orgaanisen komponentin osuus liikkuvassa faasissa on oltava korkeintaan 40-60 v-%. Täysin orgaaninen faasi kolonnissa poistaa hydrofiilisen polaarisen molekyylin kiinteästä faasista, jolloin kolonni ei toimi toivottavalla tavalla. Hitaan tasapainotuksen vuoksi, suositellaan eluointia 10 kolonnilavuutta analyysi-ajojen välillä. Isokraattista ajoa kannattaa harkita gradienttiajon tilalle, jos tämä voidaan toteuttaa. Gradientt ajo aloitetaan heikolla polaarilla orgaanisella eluentilla, jossa on pieni osuus polaarista faasia läsnä, ja polaariset yhdisteet saadaan eluoitua kolonnista lisäämällä polaarisen eluentin pitoisuutta. [29, s. 236-237; 30, s. 266-268.]

Proteiinien ja peptidien erottumiselle on käytetty paljon HILIC-kolonneja, joiden silikaan on kiinnitetty aminia kuten TSKgel Amide-80. Peptidien erotteluun käytetään yleensä gradienttia, jossa vähennetään asetonitriliä tai nostetaan suolakonsentraatiota. TSKgel Amide-80-kolonnissa ei ole tarvetta käyttää suolaa lainkaan, mutta eluenttiin on hyvä lisätä orgaanista modifioijaa kuten TFA:ta tai muita orgaanisia happoja. Happo estää peptidin jäännöksiä vuorovaikuttamasta kolonnin vapaiden silanoliryhmien kanssa. Suolagradientti sopii taas PolyHydroksietyyli A stationäärifaasi-kolonnille, joka soveltuu käytettäväksi ionisoituville yhdisteille. Kolonnia on paljon käytetty peptidien, hiilihydraattiproteiinien ja pienten polaaristen yhdisteiden analyysiin HILIC-kromatografiassa. Analyyttien ionisaatioon ei yleensä tarvita kuin 10 mM:n suolakonsentraatio. [29, s. 232-233.] [30, s. 267-268.]

5.2 Käänteisfaasikromatografian kolonnit

Käänteisfaasikromatografiakolonnit eli RP-kolonnit ovat poolittomampia kuin niissä käytettävä liikkuva faasi. Kolonnin partikkeli on päällystetty poolittomalla faasilla, joka vetää puoleensa poolittomia yhdisteitä. Pooliset yhdisteet eivät ole yhtä paljon vuorovaikutuksessa stationäärifaasin kanssa ja pysyvät enemmän poolisessa liikkuvassa

faasissa, jolloin ne erottuvat aikaisemmin kuin näytteen poolittomat yhdisteet. Käänteisfaasikromatografia on hyvin laajasti käytetty kolonnityyppi. Kiinteään partikkeliin voidaan kemiallisesti sitoa erilaisia yhdisteitä ja näin voidaan muuttaa kolonnin poolisuutta toivottuun suuntaan. Silikaan sidottaessa kiinteätä faasia esimerkiksi hyvin yleisesti käytettyä oktadekyyliketjua, niin noin puolet silanoliryhmistä saadaan sidottua ja toiset jäävät vapaiksi, steeristen esteiden vuoksi, näitä voidaan jälkeinpäin käsitellä eri yhdisteillä, ja tätä kutsutaan *end capping*. [9, s. 146.]

5.3 Normaalifaasikromatografian kolonnit

Normaalifaasikolonnien eli NP-kolonnien stationäärifaasit ovat poolisia. Liikkuvaa faasia, jota analyysissä käytetään, on kiinteätä faasia poolittomampi. Tyypilliset käytettävät faasit ovat silikaa tai alumiinia ja niihin on sidottu erilaisia poolisia faaseja. Normaalifaasikromatografiaa käytetään kun analysoitava näyte on erittäin hydrofiilinen ja pidättäytyy liian hyvin RP-kolonnin stationäärifaasissa. Vaihtoehtona on myös, että analytti ei pidättäytyy riittävästi käänteisfaasissa eli on hyvin hydrofobinen. Normaalifaasikromatografiaa käytetään myös kun tutkittava näyte liukenee tai on liuotettu orgaaniseen liuottimeen, sekä liukenee heikosti veteen tai muuhun polaariseen liuottimeen. [9, s. 164.]

6 Kromatografian suureet

Kromatografisilla suureilla lasketuilla parametreilla voidaan valita menetelmälle sopivimmat ajoparametrit, jotka antavat uudelle menetelmälle parhaat analyysiolosuhteet. Kaikkia suureita ei ollut tarvetta käyttää, koska määritettäviä analyyttejä ei ollut kuin yksi.

Retentioajalla (t_r) tarkoitetaan aika injektiohetkestä näytteen piikin huipulle. Viiveajalla (t_M) tarkoitetaan sitä aikaa jonka yhdiste on liikkuvassa faasissa, eli stationäärifaasiin pidättymättömän yhdisteen retentioaika. Todellinen retentioaika (t'_r) on se aika, jonka analytti on stationäärifaasissa, ja tämä lasketaan vähentämällä viiveaika retentioajasta (kaava 1). [7, s. 142.]

$$t'_r = t_r - t_M \quad (1)$$

Todellisen retention laskeminen. Retentiosta vähennetään viiveaika. [7 s. 142.]

Pohjaluku (N) kertoo kolonnin tehokkuudesta. Pohjaluku tulee tislauksessa käytettävästä suureesta. Pohjaluku kertoo, montako kertaa analyytti on erotuksen aikana kiinnittynyt ja irronnut stationäärisfaasista liikkuvaan faasiin. Pohjaluku on suoraan verrannollinen kolonnin pituuteen (kaava 2.). Kerroin, Gaussin käyrästä, huomioi miltä kohdalta korkeus mitataan: pohjasta (W_b), puolileveydeltä ($W_{1/2}$) vai 1/10 pohjan korkeudesta ($W_{4,4\%}$). Jokaisella analytyllä on oma erillinen diffuusiovakio kulkiessa läpi samaa kolonnia. [7, s. 145-146; 16, s. 551-552.]

$$N = 16 * \frac{t_r}{W_b} \frac{\sigma^2}{\sigma^2} = 5,545 * \frac{t_r}{W_{1/2}} \frac{\sigma^2}{\sigma^2} = 25 * \frac{t_r}{W_{4,4\%}} \frac{\sigma^2}{\sigma^2} \quad (2)$$

Pohjaluku, kerroin tulee Gaussin käyrästä riippuen mistä kohdasta piikin leveys mitataan. [7, s. 145.]

Pohjan korkeus (H) kuvaa molekyylin keskimääräistä matkaa liikkuvassa faasissa ennen kuin se tarttuu kiinni stationäärifaasiin uudestaan (kaava 3.). Lasketaan siten että kolonnin pituus jaetaan pohjaluvun kanssa. Suure tulee tislauksessa käytettävästä suureesta, jossa erottelu voitiin suorittaa erillisinä vaiheina, jota kutsutaan pohjaksi. Pohjan korkeutta voidaan myös kuvailla korkeuden ekvivalenttina teoreettiseen lukuun. [7, s. 145-146; 16, s. 551-552.]

$$H = \frac{L}{N} = 16 * \frac{L}{W_b} \frac{\sigma^2}{\sigma^2} \quad (3)$$

Pohjan korkeus. Kolonnin pituus jaetaan analyytin pohjaluvulla. [7, s. 146.]

Asymmetrisyys (AS) kuvaa ajo-olosuhteiden yhteensopivuutta. Piikit eivät aina ole symmetrisiä ja gaussimaisia. Useimmiten piikeissä esiintyy häntimistä, joskus taas keulimistä eli epäsymmetrisyyttä. Tämä johtuu ajo-olosuhteiden epätasapainosta, kromatografista menetelmää pitää vielä optimoida, stationäärifaasi ei ole paras analytyille, näyteliuos voi olla liian väkevä tai liikkuva faasi voi olla epähomogeeninen. Epäsymmetrisyys mitataan 10 %:n korkeudelta piikin pohjaviivasta. Piikin korkeimmalta kohdalta jaetaan piikki kahtia ja mitataan molempien piikinpuolikkaiden leveys 10 % korkeu-

delta. Jaetaan piikin vasemman puoleinen leveys oikean puolen leveydellä (kaava 4). [7, s. 144-147.]

$$AS = \frac{b}{a} \quad (4)$$

Epäsymmetrisyys. Piikki jaetaan kahtia sen korkeimmasta kohdasta. Piikin vasen leveys (b) jaetaan piikin oikean leveyden kanssa [7, s. 147].

7 Tilastomatemattiset suureet tulosten oikeellisuuden määrittämiseen

Saadut tulokset pitää käsitellä tilastomatemattisesti, jotta saadaan varmistettua tulosten oikeellisuus ja luotettavuus. Kalibraatiosuoran ja tulosten määrittämisessä käytetään muutamia tilastollisia suureita. Tulokset on laskettu käyttäen Excel- taulukkolaskentaohjelman eri funktioita käyttäen. Käyttämällä LINEST-funktiota saadaan suoritettua samaan aikaan kymmenen eri arvoa.

Keskiarvo (\bar{x}) lasketaan laskemalla yhteen yksittäiset mittaukset ja tulos jaetaan mitausten määrällä (n) kaava 5. [16, s. 68-75.]

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (5)$$

Keskiarvon kaava. Lasketaan yksittäisten mitausten summa jaettuna mitausten lukumäärällä. [16, s. 68-75.]

Vapausaste on havaintojen tai mitausten (n) määrä josta vähennetty yksi eli $n-1$. Vapausaste on niiden muuttujien lukumäärä, jotka voivat vaihdella menetelmän sisällä. Keskihajonnalla (s) (kaava 6) tässä otoskeksihajonnalla määritetään, miten liki keskiarvoa yksittäiset mittaukset (x_i) ovat: mitä pienempi arvo on sitä tiiviimmin keskiarvon ympärillä, sitä parempi tulos. Varianssi saadaan keskihajonnan neliöjuuresta. [16, s. 68-75.]

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (6)$$

Otoskeskihajonnan kaava. [16, s. 68-75.]

Korrelaatiokerroin (r) ja selitysaste (r^2) kertovat sen, miten lähellä täydellistä lineaarisuutta kalibraatioasuora on. Korrelaatiokerroin (r) voi olla väliltä -1 ... +1 ja mittaa, miten osuvasti kalibraatiopisteet sijoittuvat sovitetulle suoralle käyttäen lineaarista regressiota. Lineaarisuus hahmotetaan PNS (poikkeamien neliöiden summa)-suoran ja residuaalien avulla. Residuaali ε :n on lasketun ja mitatun pisteen erotus pitoisuuden funktiona (kaava 7). [16, s. 68-75.]

$$e = y_i - \hat{y}_i \quad (7)$$

Residuaalin laskentakaava. [16, s. 68-75.]

Mittaussignaalin virhe residuaalin keskihajonta lasketaan kaavalla 8. Excelin funktio STEYX(Y;X) suorittaa tämän vaivattomimmin. Vähennetään yksittäisen mitatun pisteen ja lasketun pisteen erotus, summa kaikista mittauksista [16, s. 68-75.]

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (8)$$

Residuaalin keskihajonta.

T testillä eli Student's T-testillä voidaan mitata, miten kaksi tulosta tai mittausarjaa ovat toistensa suhteen merkitseviä tai eriäviä. Ennen testiä on valittava, millä testillä analysoidaan, ovatko tulokset toisistaan riippuvaisia vai riippumattomia. Testin merkitsevyys voi olla yksi- tai kaksipuoleinen. Testin merkitsevyytenä käytetään tavallisimmin 95 %:lla todennäköisyydellä eli $t_{0,05}$, jonka suuruus riippuu toistojen määrästä. [16, s. 76-84.]

Näytteen tuloksen ilmoitetaan muodossa (kaava 9), jossa toistojen keskiarvolla ja vaihteluväli halutulla luottamisvälillä kerrottuna näytteiden keskihajonnalla ja jaettuna tulos-

ten vapausasteiden neliöjuurella. Excelissä tämän voi laskea funktiolla (TINV). [16, s. 68-75.]

$$m = \bar{x}mM \pm \frac{t_{0,05} * s}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

Tuloksen laskentakaava, miten tulos ilmoitetaan. [16, s. 68-75.]

8 Käytetty laitteisto

Käytettiin kahta eri nestekromatografialaitteistoa menetelmien etsimisessä, käytössä olivat pääasiassa preparatiiviseen työskentelyyn käytettävät laitteistot. Proteomiikassa nestekromatografia on laajempi käsite kuin analyyttisessä kemiassa. Laitteistot olivat monikäyttöiset, ja niillä pystyttiin eristämään ja puhdistamaan proteiineja sekä kvantittominaan tarvittaessa yhdisteitä. Suurin ero analyyttiseen HPLC-laitteistoon oli kolonniuunin puuttuminen ja rajoitettu paineensieto. Suurin paine, jolla laitteistot toimivat, oli 25 MPa eli 250 bar. Saaduista piikeistä kerättiin fraktiot, jotka käsiteltiin ohjeiden mukaisesti ennen varmistusta Bruker Esquire 6000 (ESI/MS) ja Bruker MALDI ultrafleXtreme™ (MALDI/TOF/TOF)-laitteilla.

8.1 GE Smart (Pharmacia)

Käytössä oli kaksi suunnilleen saman ikäistä Smart -laitteistoa (valmistumisvuosi 1991). Nämä on pääasiassa suunniteltu proteiinien eristämiseen tai puhdistukseen (kuva 14). Kolonneja voitiin liittää laitteistoon, proteiinien puhdistuksesta tuttuja kolonneja kuten HiTrap, IMAC tai Sephasil. Laitteisto mahdollisti liittää myös tässä työssä käytettävät analyyttiset kolonnit. Näytteensyöttösilmukoita voitiin käyttää erikokoisia, laitteiston mukana oli tullut 0,75 ml:sta aina 50 ml:n supersilmukan. Näytteensyöttö tehtiin manuaalisesti käyttäen Hamilton-ruiskuja, käytössä ei ollut automatisoitua näytteensyöttäjää. Kyvetti oli läpivirtauskyvetti, jonka valotien pituus on 10 mm. Analysointiin käytettävät aallonpituudet ovat kiinteät ja käytössä on 280, 215 ja 190 nm. Valotielle syöttää liikkuva peili, joka heijastaa eri aallonpituudet lampuista kutakin aallonpituutta väliajon valotielle, peiliä liikuttaa moottori. Detektorina on valomonistinputki. Ajojen hallinta tapahtuu tietokoneella Smart Assistant-ohjelmalla (V1.4A), käyttöjärjestelmä on

OS/2. Ajo-ohjelmat on ohjelmoitava itse, kone laskee ajoon kuluvat puskureiden määrän. Ylläpito- ja vuosihuolto on lopetettu kyseisen mallin kohdalla.

- Valonlähde: Hg- ja Zn-lamput, suodattimilla kiinteät aallonpituudet.
- Dedektori: Valomonistinputki
- Läpivirtauskyveti: 10 mm pitkä, erittäin herkkä
- Virtausnopeus: 0,01-10 ml/min
- Paine: 25 MPa (maksimi)
- Pumppu: 2 kpl Ruiskupumppu, 10 ml, titaanipää
- Fraction Collector Sirkulaarinen, 56 paikkainen 0,5 ml putki.
- Ohjelmisto: Smart Assistant V1.4A, Smart Manager V1.51, toimivat OS/2 ympäristössä (IBM).



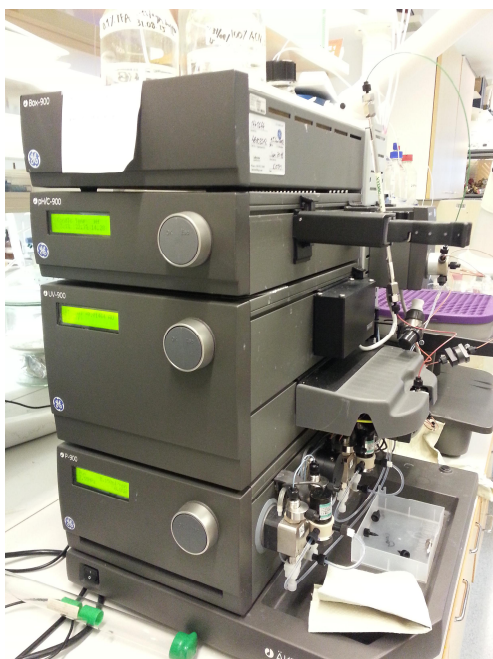
Kuva 14. GE/Pharmacia SMART-kromatografitt. Kolonniuunit ovat ikkunallisten oven takana, fraktionkerääjät laitteistojen pohjalla.

8.2 GE ÄKTApurifier 10 (Pharmacia)

Tämä on Smartista seuraavan sukupolven laitteisto. Tähän pystyttiin kytkemään peräkkäin jopa kaksi eri kolonnia ja käyttämään neljä eri eluenttia ajo-olosuhteiden säätelyyn. Laitteisto on suunnattu proteiinien preparatiiviseen työskentelyyn, varsinkin proteiinien eristykseen ja puhdistukseen (kuva 15). Rajoituksena on matala paineensietoky-

ky ja kolonniuunin puute. Käytössä on tietyt kiinteät aallonpituudet, lisänä suodattimet, joilla voidaan saada useampia aallonpituuksia käyttöön.

- Pumppu: 4 kpl resiprookkipumppua, safiirimäntä
- Paine: 25 MPa (maksimi)
- Kyvetin pituus: 10 mm, Flow Cell (ks. kuva 7)
- Virtausnopeus: 0,05-10,0 ml/min
- pH/C-900: pH:n ja konduktiviteetin seurantaan
- Fraction Collector P-950: 3 kpl eri telinettä erikokoisille fraktioputkille
- Ohjelmisto: Unicorn 5.2 ohjelma (Windows XP)
- Monitori UPC-900: 254 nm, 280 nm Xenon (Hg) lamppu; 215 nm Zn lamppu (aallonpituudet: 313, 365, 405, 436 ja 546 nm saadaan suodattimien vaihdoilla).



Kuva 15. GE ÄKTApurifier 10 laitteisto, laitteen sivulla 220 mm:n PTH-kolonne ja taka-alalla fraktionkerääjä (lila) johon mahtuu 1,5 ml:n Eppendorf-putket.

8.3 Bruker MALDI ultrafleXtreme™ (MALDI/TOF/TOF)

Näytteet kuivataan käytetystä liuottimista, jotka häiritsevät analyysia. Tämän jälkeen näytteet liuotetaan 5 µl:aan 0,1 %-prosenttiseen TFA:n. Näytteet applikoidaan kerrosvoileipäapplikaatiota käyttäen. Uudelleen liuotettu näyte pipetoidaan MALDI:n teräksiselle analysointilevylle, levylle on etsattu pieniä pyöreitä renkaita, joiden sisäpuolelle

mahtuu 5-6 µl nestettä pintajännitteen avulla; tämä muistuttaa kuoppalevyä. Näytteiden annetaan kuivua huoneenlämmössä, jonka jälkeen 1,5 µl matriisia pipetoidaan päälle ja annetaan kuivua pöydällä. Matriisi on HCCA:lla kyllästetty liuos, jossa on 1,0 % TFA:ta ja 53 % ACN:ä. Levylle (kuva 16) on myös applikoitu puhdas analyyytti (standardi) matriisilla, sekä pelkkä matriisi. Tämän jälkeen levy on valmis analysoitavaksi.



Kuva 16. MALDI:n teräksinen näytelevy, ancor plate, kuvassa on muutamia 5 µl:n kokoisia näytteitä kuivumassa huoneilmassa. Tämän jälkeen lisätään päälle matriisi, sandwich application eli kerrosleipäapplikaatio.

Lasersäde irrottaa ionit näytelevyltä viemällä energiaa matriisiin, joka puolestaan energisoi näytteen. Ensimmäinen lentorata erottaa ionit molekyylipainon mukaan muodostaen analyytin sormenjäljen. Keräys tapahtui reflektiomoodissa ja lineaarinen detektori havaitsi positiivisesti varautuneet fragmentit, erotelleen analyytit lentoaikamassa/varauksen mukaan.

- | | |
|-----------------------|-----------------------------|
| • Laserin frekvenssi: | 2000 Hz |
| • Laseri: | Smart Beam 2; Nd:YAG laseri |
| • Laserin energia: | 20-25 % maksimista |
| • Keräysmoodi: | Positiivinen, reflektio |
| • Laserin pulssi: | 5000 shots |
| • Skannausalue: | 60-1000 Da |
| • Matriisi: | HCCA (kalibraatio) |
| • Ajo-ohjelma: | Flex Control 3.4 |
| • Analysointiohjelma: | Flex Analysis 3.4 |

8.4 Bruker Esquire 6000 (ESI/MS)

Näytteen syöttö tapahtuu laitteeseen Hamilton-ruiskun avulla. Näytteessä on hyvä olla pieni määrä orgaanista modifioijaa kuten asetonitriliä ja trifluorietikkahappoa analyysin protonointiin. Nämä auttavat eluentin haihtumisessa, sekä ionien muodostuksessa. Näyte injektoidaan Hamilton-ruiskusta ruiskupumppun avulla laitteen kapillaariin jatkuvalla syötöllä. Ruiskun mäntää työntää tasaisella voimalla motorisoitu mäntä. Kapillaarista näyte 200 µl/tunnissa tulee sumuttimesta näytekammioon, jossa lämpötila on 250 °C korkea, että liuottimet haihtuvat ja jäljelle jää varautuneita hiukkasia. Käytettiin jo voimassa olevaa ohjelmaa, joka toimii myös peptidin kanssa.

· Ion Source Type:	ESI
· Mass Range Mode:	STD/Normal
· Ion Polarity:	Positive
· Energia:	2000 V
· Nebulizer Flow:	7 psi, typpi
· Drying Gas Flow:	6 l/min., typpi
· Drying Temperature:	250 °C
· Capillary Exit:	107,2 V
· Skimmer:	40 V
· Scanning Range:	50-500 m/z
· Trap Drive:	26,3
· Ajo-ohjelma:	Hexvix.met

9 Käytetyt pienlaitteet, kemikaalit ja työturvallisuus

Analyysilaitteet käsitellään edempänä, tässä on luetteloitu käytetyt pienlaitteet:

- analyysivaaka Denver Instrument Company TB-200 ±0,01 mg tarkkuus (2001-003819)
- sentifuugi Hettich Zentrifuge Mikro 24-48
- kylmävakuumi ja -sentifuugi Savant Refrigerated Condensation Trap ja Speed Vac Concentrator
- ultraäänihaude GWB, Branson 200
- Biohitin ja Sartoriuksen pipettejä 10 µl-5,00 ml sekä kärkeä

Kaikki käytetyt kemikaalit olivat HPLC ja molekyylibiologista tasoa. Kaikki käytetty vesi oli MilliQ laatuista vettä.

- Asetonitrili CH_3CN , Avattu: 11/2015, käytettävä 3 vuoden sisällä avaamisesta, Fisher Scientific LC-MS grade, LOT: 1527458
- Ammoniakki NH_3 25 %, für analyse, Riedel-deHaen. LOT 62840
- Trifluorietikkahappo CF_3COOH 99,5 %, (LC/MS-grade) Arcos Organics, LOT: A0344878
- Muurahaishappo CHOOH , puriss. 98-100 %, Sigma-Aldrich. LOT 81420
- HCCA (CHCA), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, REF: 8255344; LOT: 0000228829; Exp.: 2017-04; portioned Matrix for Maldi-Tof-MS, Bruker
- Ammoniumformaatti CHONH_3 (MS-grade) Fluka, LOT: 1386428

Työssä käytettiin laboratorioissa käytettävää normaalia työturvallisuutta, tarvittaessa käytettiin henkilökohtaisia suojavälineitä, jotta vältettäisiin altistumista kemikaaleille.

10 Testattavat kolonnit

10.1 Applied Biosystems PTH C18 (5.0 μm , 4.6 * 220 mm)

Kolonne on Applied Biosystems PTH (phenylthiohydantoin) C18-kolonne, käänteisfaasisikolonne. Kolonnin silikamatriisi on käsitelty C18:sta ja kolonnin silikaresiduaalit on käsitelty niin, että matriisi toimii erittäin hyvin proteiinin sekvensoinnissa, jota käytettiin paljon aiemmin menetelmänä. Lähdemateriaalia oli hieman hankalaa löytää kyseiselle pylväälle. Kolonnia käytettiin aiemmin peptidien sekvensointiin. Tutkittava proteiini derivoitiin PICT:lla (phenylisothiosyanate eli fenyyli-isotiosyanaatti), joka kiinnittyi proteiinin ensimmäiseen aminohappoon, joka sitten katkottiin voimakkaalla orgaanisella hapolla. Saatu aminohappoderivaatti PTH-Ah analysoitiin proteiinisekvensaattorilla tämän kolonnin voimin. Kolonnin matriisi kestää seuraavia olosuhteita: paine max. 4,8 MPa (700 psi), pH 2,2-8,0, + 55 °C:seen. Työssä käytettiin kolonnia normaalina RP-kolonnina. Kolonne toimi hyvin proteiinien ja peptidien erottelussa. [31, s. 1-2, 9-11.]

10.2 Waters Atlantis HILIC SILICA (3.0 µm, 2.1 * 100 mm)

Atlantis HILIC -kolonni on paljas silikapohjainen stationäärifaasipartikkeli, jonka partikkelikoko on 3 µm. Kolonnin matriisi kestää seuraavia olosuhteita: pH alue 1-5, painetta 6000 psi:tä (400 bar = 40 MPa). Matriisi on stabiili lämpötilan ollessa +20-45 °C. Pieni partikkelikoko nopeuttaa kromatografiaa, optimaalisilla virtausnopeuksilla tehostaen analysointiaikoja. HILIC:n kolonnien tapaan, kolonnin matriisi reagoi hitaasti muutokseen. Ohjeissa tasapainotus käyttöönotossa 50 kolonnilavuutta (CV) eluenttia ja ennen näytteen injektointia, tasapainotus ensimmäisellä eluentilla (-puskuri) 20 CV. Gradienttiasiossa kolonnin tasapainotus on 10 CV ajojen välillä. Eluentissa on oltava koko ajan 5 % polaarista liuotinta, jotta silikapartikkeli on koko ajan hydroituna ja toimii. Orgaanista eluenttia on oltava vähintään 40 % liikkuvassa faasissa tai gradienttiasiossa huomioituna. Jatkuva vähintään 10 mM suolapuskurikonsentraation ylläpito ajoliuoksessa parantaa piikin muotoa. Valmistajan ohjeiden mukaan on suotavampaa käyttää puskureissa modifioijina ammoniumformaattia tai ammoniumasettaattia kuin muurahaishappoa tai etikkahappoa, koska puskurit tuottavat parempaa toistettavuutta kuin hapolliset modifioijat. Käytettäessä modifioijia kuten muurahaishappoa on parempi käyttää 0,2 % (V:V) kuin 0,1 % (V:V). [32.]

10.3 Phenomenex Kinetex HILIC Silica (2.6 µm, 2.1 * 50 mm, 100 Å)

Kinetexin kiinteän faasin partikkelin ydin on pellikulaarinen, ja sen päälle on kiinnitetty silikafaasi. HILIC -kolonneja on kehitetty erilaisia ja silikalle on sidottu eri stationäärifaaseja. Kiinteän ytimen vuoksi kolonnin paineet eivät nouse yhtä korkealle kuin samankokoisen, huokoisen partikkelin kolonnissa. Tästä syystä voidaan käyttää pienempää partikkelikokoa erotuksessa. Massansiirto on myös nopeampaa ohuessa stationäärifaasissa, jolloin näytevyöhyke levenee vähemmän erotuksen aikana, kuin vastaavissa huokoisten partikkelien kolonneissa. Kolonni on stabiili 2,0-7,5 pH:ssa tyypillisissä asetonitrili-vesi eluentilla. kolonnin matriisi kestää 600 bar (60 MPa) tai 8700 psi:tä ja on stabiili lämpötilaan +60 °C:ta asti. [18; 33.]

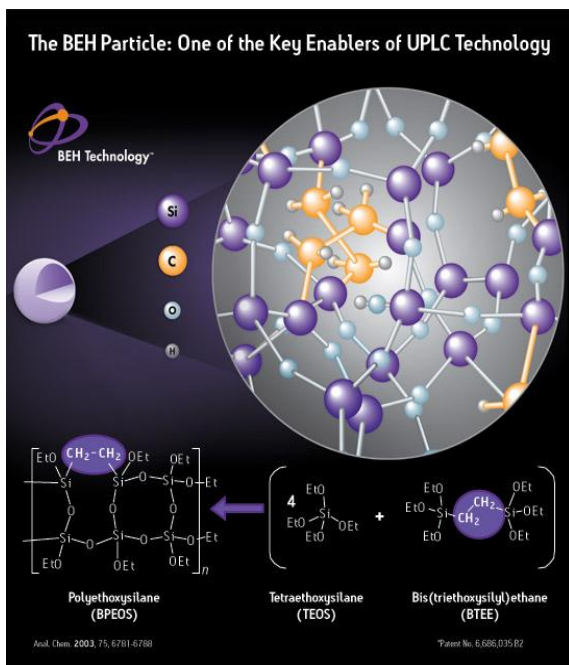
10.4 Waters Acquity UPLC BEH HILIC (1.7 μm , 1.0 * 100 mm)

Kiinteäfaasinen BEH (Ethylene Bridged Hybrid) partikkeliin on silanoliryhmien väliin kemiallisesti jälkikäsitteilyllä sidottu eteeniä silloiksi, jotta rakenne olisi kemiallisesti kestävämpi. [9, s. 167-169.]

Kolonnin pieni partikkelikoko 1,7 μm on vain UHPLC-laitteiston käyttöön. Watersin partikkelit ovat täysin huokosia ja kolonnin vastapaine nousee erittäin korkeaksi. Kolonni kestää paineita 18000 psi (1241 bar eli 12,4 MPa), ja lämpötila max. +45 °C. Kolonnin matriisi on stabiili pH 1-9 välillä. BEH HILIC kolonneissa ei ole pinnalle sidottua faasia, joten ne eivät ole yhtä kestäviä kuin muut BEH-kolonnit. BEH-kolonnit retentoivat 20 v-% vähemmän gradienttiajossa ja 35-65 v-% isokraattisissa ajoissa kuin vastaavat Atlantis-kolonnit. [34.]

10.5 Waters X Bridge C18 (5 μm , 4.6 * 150 mm, 100 Å)

Kolonnin syntetisoitu matriisi sisältää sekä epäorgaanista silikaa että silikan Si-O-sidosten väliin sidottua 1,2-bis(siloksi)etaania ristikkäin. Vapaat silanoliryhmät on jälkikäsitelty lyhyillä alkyyliketjuilla, jotta parannettaisiin kolonnin kemiallista kestävyyttä. Tämä ristiksidosis antaa lujuutta partikkeleihin ja paremman kemiallisen kestävyuden (kuva 17). Silanoliryhmien jälkikäsitteily on lisännyt kolonnin pH-kestävyyttä 1-12. Kolonnin matriisi kestää ja toimii puhtaassa vesifaasissa, sekä täysin orgaanisten liuosten kanssa. Kolonnin matriisi on stabiili +20-90 °C, kestää painetta 6000 psi:tä 400 bar (40 MPa). [9, s. 167-169; 35.]



Kuva 17. Watersin kolonnien rakenne. Silanoliryhmät on jälkikäsitelty kemiallisesti alkyyliryhmillä. Samankaltaisten käsittelyjen jälkeen saadaan BEH- ja X Bridge-kolonnit. [36.]

10.6 Phenomenex Kinetex EVO C18 (5 µm, 4,6 * 250 mm, 100Å)

Kiinteäytimelliselle eli pellikulaariselle partikkelille kiinnitetty kemiallisesti C18 eli alifaattinen oktadekaaniketju. Partikkelikoko 5 µm ja kolonnin sisäinen halkaisija 4,6 mm, näin paine ei nouse käytön aikana liian korkeaksi. Lisäksi kolonnin pituus 250 mm parantaa erotuskykyä. Kolonni on stabiili pH 1-12 välillä, vesipitoisilla vesifaaseilla normaaleissa käänteisfaasi erotuksissa. Kolonni kestää painetta 8700 psi:tä (600 bar eli 60 MPa), ja matriisi on stabiili +60 °C asti. Ohut aktiivinen pintakerros mahdollistaa nopean massansiirron, ja erotustehokkuus on hyvä. Kiinteä ydin ei aiheuta kolonniin korkeata vastapainetta kuten huokoinen tai täysin huokoinen partikkeli. Pitkä kolonni lisää erotustehokkuutta mutta samalla myös analyysiaikaa. Tämän pituinen kolonni sopii hyvin analyysiin, jossa on paljon erilaisia analyyttejä samassa näytteessä. [37.]

11 Käytetyt puskuriparit

Käänteiskromatografian A-puskuri on vesipitoinen eluentti, johon on lisätty trifluorietikkahappoa (TFA) tai muuta pH:ta säätelevä yhdistettä. Ionisoituvalle analyyttille on tärkeää, että ovat kromatografian kannalta yksittäisvarautuneessa muodossa, joka sa-

mallalla supressoi kolonnin vapaita silanoliryhmiä. Asetonitrili on orgaanisena modifioijana B-puskurissa, jossa on samaa happoa kuin puskuri A:ssa. Peptidin stabiloituminen tiettyyn pH arvoon auttaa eluointia, retentioajan vakiintumiseen sekä kvantitointia. [29, s. 232-233; 38, s. 111-117; 39, s. 187-188; 40, s. 142.]

HILIC-kromatografiassa kolonnin ollessa poolinen A-puskuri on pääasiassa orgaaninen eluentti, jossa on pieni määrä poolista eluenttia, jotta kolonnin silanoliryhmät pysyvät poolisena. Puskuriin on myös lisätty suolaa tai happoa, tarkoituksena on lisätä analyytin hydrofobisuutta ja varausta, muuttamalla peptidiä sopivaksi retentiota varten. B-puskuri on hydrofiilisessä vuorovaikutuskromatografiassa poolinen eluentti, yleensä vesi, johon on lisätty suolaa tai happoa, jotta sen pH pysyisi samana. [29, s. 232-233; 30, s. 265, 269, 273.]

Käänteiskromatografiassa B-puskuri on yleensä pooliton orgaaninen eluentti. Asetonitriliä käytetään yleisesti orgaanisena eluenttina lievän poolisuutensa, sekä matalan viskositeettinsa vuoksi, koska se ei kehitä vastapaineita laitteiston sisällä. [7, s. 161.] [30, s. 269-270; 38, s. 117-118; 39, s. 18-189; 40, s. 145; 41, s. 3569-3570.]

Trifluorietikkahappoa käytetään yleisesti, se sopii hyvin haihtuvuutensa ja ionisaatioominaisuutensa vuoksi sekä massaspektrometrille että MALDI:lle. (ks. taulukko 2 ja 3). [24, s. 88-89.]

Ammoniumformaatti on neutraali suola, jonka pH:ta voidaan muuttaa happo- tai emäslisäyksellä sopivaksi. HILIC:n kanssa, pH säädettiin 4,5:een ja emäksisessä ajoliuoksessa 10:een. Suola sopii ionisoituvuutensa vuoksi käytettäväksi sekä ESI/MS:n että MALDI:n kanssa. [24, s. 86-91; 38, s. 111-118; 39, s. 187-196; 41, s. 3568-3570.]

11.1 Käänteisfaasikromatografian hapan puskuri

Käänteisfaasikolonniin kanssa käytettiin vesipitoista pääeluenttia. Eluentin lisäaineena oli hyvin paljon käytetty TFA:ta eli trifluorietikkahappoa 0,1 %:n vahvuutena, pitämään pH:n happamalla (pH n. 2,5). TFA sopii hyvin käytettäväksi eluentin pH:n säätäjänä kun analyysiä jatketaan, joko ESI/MS:llä, tai MALDI:lla. Orgaanisena modifioijana käytettiin asetonitriliä. Ajon aikana on analyytin pintavaraukselle eduksi että pH pysyy sa-

mana, joten happoa lisättiin myös saman verran orgaaniseen eluenttiin. [24, s. 86-91; 26; 38, s. 111-116; 39, s.187-190.]

11.2 Käänteisfaasikromatografian emäksinen puskuri

Käänteisfaasikolonniin (RPC) kanssa voidaan käyttää myös puskuria, jonka pH on toisessa äärilaidassa, emäksisenä. Yhdistelemällä ammoniakia ja muurahaishappoa puskuriksi ja säätämällä pH 10:een ammoniakilla saadaan peptidin varaus negatiiviseksi, jolloin peptidin karboksyyli-ryhmä on dissosioituna. Vaatimus on, että käytettävä kolonni on modifioitu jälkikäsittelemällä vapaat silanoliryhmät, ettei silika reagoi korkeassa pH:ssa liikkuvan faasin kanssa. Asetonitriliä on taas käytetty orgaanisena modifioijana. Kirjallisuudesta löytyy menetelmiä, jossa on käytetty ACN:ää sekä puhtaana että yhdistettynä veteen, sekä puskuroituna. Puhtaana sitä on käytetty Yangin tutkimuksessa gradienttiajossa kumminkin korkeintaan 65-prosenttisena liikkuvan faasin volyymistä. Ammoniumformaatti tehdään 200 mM kantaliuoksena, käyttäen ammoniakia ja muurahaishappoa oikeassa suhteessa, jonka jälkeen säädetään pH sopivaksi ammoniakilla. Kantaliuos laimennetaan 20 mM:ksi puskureihin. Spicerin tutkimuksessa, oli käytetty asetonitrili-vesi-eluenttia, jossa vettä oli 10 v-% puskurin volyymistä. [10, s. 3767-3770; 11, s. 8762-8767.]

11.3 HILIC-kolonniin hapen suolapuskuri

HILIC-kolonneissa pääeluenttina oli orgaaninen liuotin, myös tässä asetonitrili on hyvin useasti käytetty eluointiliuotin, koska se ei nosta paineita matalan viskositeettinsa vuoksi. Tangin artikkelissa löydettiin ohjeet liikkuvalla faasilla ja toimiva gradientti, josta lähdettiin muokkaamaan sopivaa menetelmää. Artikkelissa käytetty kolonni ei ollut puhdas HILIC -silika-kolonni, vaan kolonnin silika oli modifioitu. Käytetty kolonni tutkimuksessa oli TSKgel Amide-80 (1.0 mm * 250mm, 5 µm, 100Å, Tosoh Bioscience). Ammoniumformaattista tehtiin 200 mM:n kantaliuos, jonka pH säädettiin 4,5:een muurahaishapolla. Tästä laimennettiin 10 mM:ksi ajoliuoksin mittalasi tarkkuudella. [29, s. 232-233; 41, s. 3569.]

12 Työn kulku

12.1 Peptidin punnitus

Tripeptidiä oli syntetisoitu asiakkaalle aiemmin, saatiin pieni määrä Eppendorf-putkessa. Peptidi säilytettiin -20 °C:ssa. Puhdasta IPP:tä punnittiin (2,50 mg \pm 0,01 mg) analyysivaalla Eppendorf-putkeen ja liuotettiin laboratorioveteen (18,2 M Ω). Saatua punnitustulosta käytettiin pohjana kantaliuoksen konsentraation laskemiselle, jonka pitoisuudeksi saatiin 10 mM. Kantaliuos säilytettiin pakkasessa -20 °C. Tästä tehtiin tarvittavat standardilaimennokset ajoja varten. Laimennokset tehtiin analyysissä käytävään ajopuskuriin. Standardit olivat 0,05-10 μ g. Koeajoja varten liuotettiin myös muita peptidejä, millä varmistettiin lähinnä kolonnin toimivuutta ennen tutkittavan peptidin käyttöönottoa.

12.2 Liuosten teko

Ajoliuokset tehtiin aina HPLC-laatusista reagensseista ja ilma poistettiin käyttämällä ultraääntä ja vakuumia. Liuoksiin ei saa jäädä ilmaa, joka jäädessä laitteistoon aiheuttaa paineen vaihteluita, tukoksia, epätasaista kohinaa sekä retention heittelyitä. Liuokset tehtiin mittalasitarkkuudella ja TFA lisättiin puhtaana pipettejä käyttäen. Ennen kolonnin tasapainotusta työpäivän alussa ajoliuokset sonikoida ultraäänihauhteessa; varsinkin asetonitriliseokset keräsivät ilmaa. Puskurien kantaliuokset tehtiin ja ne laimennettiin puskureihin. Puskurien kantaliuosten pH:t tarkistettiin ennen ajoliuosten tekoa, samoin ajoliuokset kaasunpoiston yhteydessä.

12.3 Puskurit ja niiden teko

Tutkittava kolonni liitettiin aina laitteeseen ajoliuoksen liikkeessa, pisarasta pisaraan liitännällä (drop-to-drop connection), vältetään näin että ilmaa pääsee systeemiin. Päivittäin on poistettava puskureista ilma, joko alipaineessa sonikoimalla tai suodattamalla ellei laitteistossa ole ilmanpoistajaa. Ennen ajoa kolonni oli tasapainotettava ajoliuoksella ennen analysoinnin alkua. Kolonniohjeissa suositellaan tasapainottamaan yleensä 10 CV (kolonnin tilavuutta). Kolonnin kemiallinen koostumus ja kestävyys määräävät, mitä ajoliuoksia, lämpötiloja, paineita sekä modifioijia voidaan käyttää. Tässä kiin-

teäfaasin silikan modifiointi on hyvä tietää, koska vapaat silanoliryhmät rajoittavat käytettävää pH-aluetta. Nykyään voidaan silanoliryhmät päällystää, jolloin pH käyttöalue laajenee. Käänteisfaasikolonnit tasapainotetaan poolisella eluentilla, jossa on lisäaineita stabiloiden analyyttia.

12.3.1 Käänteisfaasikromatografian hapan puskuri

Puskuri A:

- 100 ml H₂O (HPLC grade)
- 100 µl TFA:ta (LCMS-grade)

Puskuri B:

- 60 ml ACN (HPLC grade)
- 40 ml H₂O (HPLC grade)
- 100 µl TFA:ta (HPLC grade)

ÄKTA:ssa ilmenneiden pumppuongelmien vuoksi jouduttiin muuntamaan eluentin koostumusta lisäämällä vettä asetonitrili-trifluorietikkahappo-eluenttiin. Pumppu toimi vesieluentilla, mutta puhdas asetonitrili sai pumpun toimintakyvyttömäksi. Ongelma pieneäni, mutta ei poistunut purkamalla, pesemällä ja sonikoimalla kaikki pumppujen osat. Ajoliuokset olivat seuraavat A-puskurina: 0,1 % TFA:ta ja B-puskurina 0,1 % TFA:ta 60:40 ACN:H₂O:ssä. Gradienttia muutettiin vastaamaan muutosta laskemalla prosenteissa tapahtunut muutos. Käytettäviä gradientteja oli useita, käytettävän kolonnin pituus vaikutti ajon parametreihin. Gradientin muutos pysyi samana, eri kolonnien pituudet vaikuttivat ajoajan pituuteen, joten gradientin jyrkkyys vaihteli.

12.3.2 Käänteisfaasikromatografian emäksien puskuri (pH 10)

Kantaliuos ammoniumformaatti 200 mM, väkevänä (1000 ml):

- 15,57 ml ammoniakkia 25 % (HPLC grade)
- 1,62 ml muurahaishappoa (HPLC grade)

- 900 ml H₂O (HPLC grade)

Säädettiin pH 10:ksi ammoniakilla, liuos siirrettiin dekantterilasista mittapulloon ja täytettiin merkkiin. Ajoittain kannattaa tarkastaa liuoksen pH, se voi muuttua ja näkyä peptidin piikin leviämisenä.

Puskuri A:

- 90 ml H₂O (HPLC grade)
- 10 ml 200 mM ammoniumformaattia (pH 10)

Puskuri B:

- 60 ml ACN (HPLC grade)
- 40 ml H₂O (HPLC grade)

Vanhasta työohjeesta löytyi sopiva puskurin teko-ohje (artikkeli kadonnut). 28-prosenttista ammoniakkia otettiin 13,9 ml dekantterilasiin, jossa on 900 ml laboratorialaatuista vettä. Lisätään 1,62 ml muurahaishappoa, säädetään pH 10:ksi käyttämällä ammoniakkia tai muurahaishappoa. Koska käytössä oleva ammoniakki oli 25-massaprocenttista ja jouduttiin laskemaan ammoniakin volyymi uudestaan ja pipetoi-
maan tätä 15,57 ml. Siirrettiin mittapulloon ja täytettiin vedellä merkkiin.

ÄKTA:ssa ilmenneiden pumppuongelmien vuoksi jouduttiin muuntamaan eluentin koostumusta lisäämällä vettä asetonitrili-eluenttiin, samalla tehtiin päätös lisätä puskuria, koska laskettaessa asetonitriliin määrää gradientissa huomattiin että uusi gradientti menee käytetyllä vesilisäyksellä 100 %:iin. Ajoliuokset olivat A-puskurina 20 mM ammoniumformaattia ja B-puskurina 20 mM ammoniumformaattia 60:40 ACN:H₂O. Gradienttia muutettiin vastaaman veden lisäyksen aiheuttamaa muutosta. Peptidi eluoituu 20-prosenttisella puhtaalla asetonitrililisäyksellä jolloin puskurilla, jossa on 60 % asetonitriliä, B-puskurin osuus on 33 %. Ajettiin myös ajoja, jossa ei ollut lisätty ammoniumformaattia asetonitrili-vesi-eluenttiin, tulos ei muuttanut tulosta huonompaan suuntaan. B-puskurin tehtävä gradienttiajossa oli tarkoitus myös muuttaa samalla eluentin pH:ta. Jätettiin täten ammoniumformaatti B-puskurista pois.

Gradienttiao: 0 % B-puskuri, 1 min; 0-20 % B-puskuri, 5 min; 20-35 % B-puskuri, 15 min; 35-100 % B-puskuri, 2 min; 100 % B-puskuri, pidä (hold) 2 min; 0-100 % B-puskuri, 0,1 min; 0 % B-puskuri, 4 min (tasapainotus).

Isokraattinen ajo: 0 % B 1 min; 0-33 % B 1 min; 33 % B pidä (hold) 25 min; 33-100 % B 2 min; 100 % B pidä (hold) 2 min; 0-100 % B 0,1 min; 0 % B 4 min (tasapainotus).

12.3.3 HILIC-kolonniin hapan suolapuskuri

Ammoniumformaattista tehtiin 200 mM:n kantaliuos, jonka pH säädettiin 4,5:een muuraishapolla.

Puskuri A:

- 95 ml ACN (HPLC grade)
- 5 ml 200 mM ammoniumformaattia (pH 4,5)

Puskuri B:

- 95 ml H₂O (HPLC grade)
- 5 ml 200 mM ammoniumformaattia (pH 4,5)

Tangin tutkimuksessa käytetty gradientti-ohjelma oli seuraavanlainen: 0-10 % B-puskuri, 0-10 min, 10-30 % B-puskuri, 10-45 min; 30-90 % B-puskuri, 45-55 min; 90 % B-puskuri, 55-60 min; 90-0 % B-puskuri, 60-60,01 min; 100 % A-puskuri, 60,01-70 min. Gradientissa ilmenee HILIC-kolonniin vaatimukset, pidetään kolonniin vapaat silikaryhmät hydroituna koko ajon aikana, sekä pitkä (10 min) tasapainotus [41]. Muokattiin ajo ajolta gradienttia jyrkemmäksi kunnes saatiin peptidi eluoitua. Kokeilut kirjattu seuraavasti lyhyesti ja [B] tarkoittaa B-puskurin osuus ajoliuoksessa. Kuvat gradienteista ja eluoiduista piikeistä on koottu liitteeseen 5.

Gradientti 1: Nosta 0-10 % [B] 5 minuutissa, sitten 10-30 % [B] 10 minuutissa, seuraavaksi 30-90% [B] 3 minuutissa, laske 90-0% [B] 0,1 minuutissa ja tasapainota 0% [B] 4 minuuttia.

Gradientti 2: Nosta 0-30% [B] 5 minuutissa, sitten 30-90% [B] 10 minuutissa, pidä (hold) 90% [B] 3 minuuttia, laske 90-0% [B] 0,1 minuutissa ja tasapainota 0% [B] 4 minuuttia

Gradientti 3: Nosta 0-15% [B] 15 minuutissa, sitten 15-90% [B] 15 minuutissa, pidä (hold) 90% [B] 5 minuuttia ja laske 90-0 % [B] 0,1 minuutissa, tasapainota 0% [B] 4 minuuttia.

Toimiva gradientti, kokeen neljäs gradientti, oli seuraavanlainen: 0-50 % B-puskuri 0-10 minuuttia, 50-90 % B-puskuria 10-30 minuutissa; 90 % pidä (hold) B-puskuria, 30-35 minuuttia; 90-0 % B-puskuria; 35,00-35,01 minuuttia; 0 % B-puskuria 35,01-39,0 min.

Kolonni oli lyhyt ja kapea, ja injektointiin liian suuria määriä peptidiä standardisuoraa tehdessä. Piikit olivat kaksiosaisia, eli kolonni ylikuormittui, josta syystä kolonnia jouduttiin pesemään puhtaaksi kontaminanteista. Piikin muoto ei ollut paras mahdollinen, joten päätettiin siirtyä seuraavaan ja palata tähän kolonniin myöhemmin ajan salliessa. Pitää löytää sopiva injektointimäärä, sekä muokata ajoa siten, että käytössä on loivempi gradientti, sekä ajon lopussa on pidempi tasapainotus, jotta pohjaviiva olisi ajon aikana parempi.

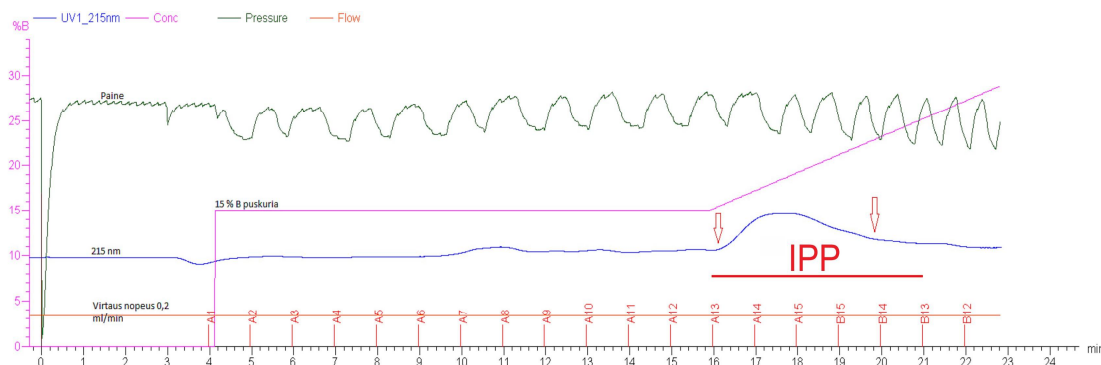
12.4 Koeajot

12.4.1 Gradientti

Testattiin eri gradientteja, muuttaen gradientin jyrkkyyttä esim. 0-35 v-% tai vain 0-25 v-% B-puskuria liikkuvassa faasissa. Gradientin aikaa muutettiin myös, kokeiltiin ajaa 10-20 minuutin ajan 0-35 v-% B-puskurin osuutta ja seurattiin muutoksen vaikutusta peptidin erottumiseen. Vertailtiin kromatogrammeja, jotta saatiin aikaan parhaiten eluotanut standardipiikki. Eluoinnin pituuteen vaikutti kolonnin pituus, kolonnilavuus (CV) ja näytteen matriisin puhtaus. Pohjana käytettiin laboratoriossa toimivaa toimivaa gradienttiohjelmaa sekä Tangin julkaisusta, jota muuntamalla sopivaksi laitteelle sekä kolonnille, saadaan toimiva gradientti analysoitavalle analyylille. Osasta ajoista varmistettiin piikin koostumus, joko ESI/MS:llä tai MALDI TOF/TOF:lla.

12.4.2 Step-gradientti

Toinen tapa määrittää analyytin eluoinnille tarvittava määrä orgaanista puskuria on step-gradienttikoe.

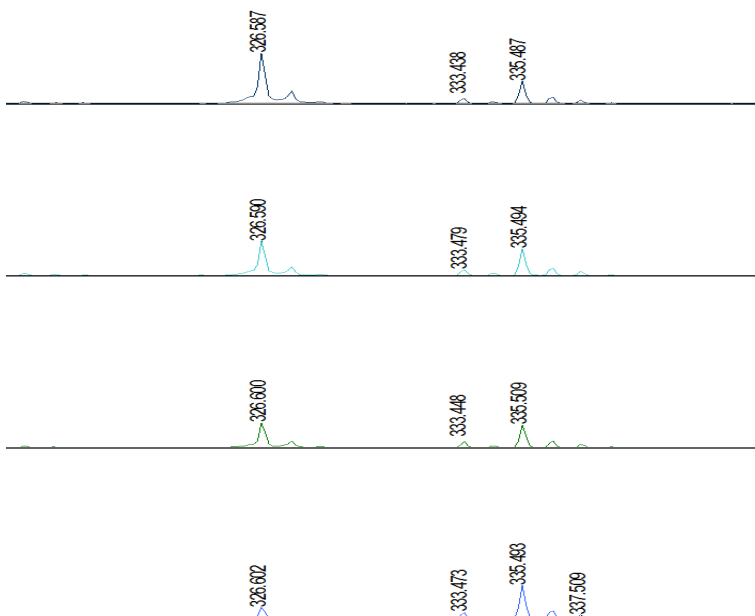


Kuva 18. Step-gradientin varmistusajo, kuvaajasta näkyy IPP:n eluoituvan 15 % B-puskurin lisäyksen jälkeen n. 12,5 minuutin kohdalla. Paineen (vihreä) vaihtelua josta näkee ACN:n ja veden reagointi toistensa kanssa. Absorbanssin (sininen) muutos (215 nm), IPP eluoituu. Varmistus tehtiin analysoimalla fraktiot A13-B12 (serpentiinikeräys) MALDI:lla. Eluentin lisäys (pinkki) 15 %. (Kuvavuutukopio ajosta.)

Tällä saadaan selville B-puskurin pitoisuus ajoliuoksessa jotta analyytin irtoaisi stationääri- ja eluofaasista. Injektoidaan standardia ja nostetaan manuaalisesti 5 v-% B-puskurin osuutta kerrallaan ja ajetaan tällä määrällä 10-15 minuuttia, jonka jälkeen nostetaan uudestaan B-puskurin osuutta 5 v-%. Näin jatketaan kunnes nähdään detektorista standardin eluoituvan piikkinä (kuva 18). Tarvittaessa voidaan varmistaa piikin autenttisuus toistamalla koe vain saadulla B-puskurin osuudella. Kerätään samalla ajosta fraktioita, josta vielä tehdään varmistus MALDI-TOF/TOF:lla tai ESI/MS:llä.

Kerätyt fraktiot, jotka kiinnostivat, varmistettiin joko MALDI:lla tai ESI/MS:llä. Tunnistettavat fraktiot laimennettiin edelleen ajopuskuriin ja analysoitiin. Vakuumikuivattiin muutamia fraktioita, tulosta ei voitu varmistaa MALDI:lla, jolloin näytteet laimennettiin ja ajettiin ESI:llä. SMART:lla ja X Bridge -kolonnilla ajettu kiinnostava fraktio F11 ajettiin ESI:llä ja saatiin varmistus eluoituneen piikin koostuneen IPP:stä. Tämä piikki eluoitui kokonaisuudessaan yhteen 0,2 ml:n fraktioon. SMART:lla virtausnopeus on 100 µl/minuutissa (0,1 ml/min), joten peptidi eluoitui kahden minuutin sisällä.

12.4.3 Jälkivarmistus



Kuva 19. MALDI:n ajo EVO C18 eri fraaktiosta. IPP (m/z) 326.60 Da. Kaksi ylintä fraktiota nähtiin piikkinä kromatogrammissa, kahden alemman pohjaviiva oli tasainen.

MALDI:lla varmistetut näytteet kuivatettiin ensiksi Savantin kylmävakuumi kylmäevaporaattorilla (Refrigerated Condensation Trap) ja siihen liitetyllä sentrifugilla (Speed Vac Concentrator) kuivaksi eluentista ja tämän jälkeen liuotettiin 5 μ l 0,1 % TFA:han. Kaikki eluentit eivät sovi MALDI:lle, vaan voivat häiritä analysointia. Näyte (5 μ l) pipetoitiin teräksiselle näytelevylle (ancor plate, kuva 16) ja annettiin kuivua huoneenlämmössä kuivaksi. Tämän jälkeen pipetoitiin matriisipinnalta (HCCA-resepti 1,0 % TFA:ta 53 % ACN ja kyllästetty HCCA, sakkaa pohjalla) 1,5 μ l:a, jokaisen näytteen päälle ja annettiin kuivua. Levylle pipetoitiin myös yhdelle näytealueelle pelkkää matriisia, tämä on positiivinen näyte. Tämän jälkeen teräksinen levy asennettiin laitteen näytekammioon, josta laite siirsi levyn ionisointikammioon, pumppasi tyhjiön näytekammioon ja analysoi näytteet. Laite analysoi kaikki näytteet, myös matriisin, jota käytettiin maskina näytteille ja näin voitiin suodattaa pois matriisin piikit. Laseri viritti näytteen peptidiä ja TOF-TOF mittasi lennetyn ajan ja saatiin varmistus peptidistä. Kromatogrammista (kuva 19) näkyi matriisin seasta piikki kohdassa 326.60 (m/z) Da, tämä on IPP:n ioni ja protoni (H) eli $[M+H]$.

13 Tulokset

13.1 Peptidi, kantaliuoksen teko

Työ aloitettiin standardin punnituksella. Teoreettinen lasku, paljonko peptidiä pitää punnita kantaliuoksen tekoon ja peptidille sopiva konsentraatio.

$$M = 325,42 \text{ g} / \text{mol}$$

$$c = 1 \text{ mM}$$

$$V = 1 \text{ l}$$

$$n = c * V = 1 \text{ mmol} / \text{l} * 1 \text{ l} = 1 \text{ mmol}$$

$$m = n * M = 1 \text{ mmol} * 325,42 \text{ mg} / \text{mmol} = 325,42 \text{ mg} = 0,32542 \text{ g}$$

Tarvitaan 325,4 mg peptidiä 1 mM liuoksen tekoon, jos tarve on 1 litra. Todettiin, että laskuissa 1 mM liuoksen teko 1,5 ml Eppendorf-putkeen on analyysivaa'an (Denver TB-200) punnitusrajan ulkopuolella, olisi punnittava 0,325 mg eli 0,000325 g. Päädyttiin tekemään 10 mM kantaliuokseen. Punnittava olisi silloin noin 3,25 mg (0,00350 g), jonka voisi liuottaa Eppendorf-putkeen.

$$c = 10 \text{ mM}$$

$$V = 1 \text{ ml} = 0,001 \text{ l}$$

$$n = c * V = 10 \text{ mmol} / \text{l} * 0,001 \text{ l} = 0,01 \text{ mmol}$$

$$M = 325,42 \text{ mg} / \text{mmol}$$

$$m = n * M = 0,01 \text{ mmol} * 325,42 \text{ mg} / \text{mmol} = 3,2542 \text{ mg}$$

Punnittu tarkasti peptidiä 0,00250 g eli 2,50 mg ($\pm 0,01$ mg) analyysivaa'alla. Laskettu mihin tilavuuteen punnittu määrä pitää laimentaa, jotta saadaan sama konsentraatio eli 10 mM. Laskettiin lasku toiseen suuntaan vielä varmistukseksi. Seuraavaksi laskettiin tarvittavat laimennokset, josta injektoidaan standardisuoran standardit. Standardit mietittiin sopimaan silmukan tilavuutta. Päädyttiin käyttämään näytteen sisältämää IPP:n massaa (μg) konsentraation tilalla, koska tällöin voidaan injektoida Hamilton-ruiskulla eri määriä näyteliuosta ja käyttää samaa suoraa.

$$\frac{3,2mg}{1,0ml} = \frac{2,5mg}{x}$$

$$x = \frac{2,5mg}{3,2mg / ml} = 0,7683 \text{ ml}$$

$$m = 2,5mg$$

$$M = 325,42 \text{ mg} / mmol$$

$$n = \frac{m}{M} = \frac{2,5mg}{325,42 \text{ mg} / mmol} = 0,00768237 \text{ mmol}$$

$$V = 0,768 \text{ ml}$$

$$c = \frac{n}{V} = \frac{0,00768237 \text{ mmol}}{0,768 \text{ ml}} = 0,01003 \text{ mol} / l \gg 10,0mM$$

13.2 Laimennokset standardisuoraa varten

Kantaliuoksesta (IPP) 10 mM laimennetaan käytettävään ajoliuoksen puskuriin, jotta vältetään näytevyöhykkeen leviämiseen kolonnissa. Pipetoitiin kantaliuosta Eppendorf-putkeen, lisättiin ajopuskuria tarvittava määrä. Tarvittaessa syntyneestä laimennoksesta tehtiin seuraava laimennos. Alussa tehtiin valmiiksi koko laimennossarja, jota injektointiin silmukan volyymiä kaksinkertainen määrä laimennosta, 100 µl silmukkaan 200 µl standardia. Aikaa kului laimennosten tekoon, joten laimennoksia yksinkertaistettiin. Lopulta tehtiin vain muutama laimennos, josta otettiin ruiskuun eri määrä laimennosta ylittämättä silmukan puolta tilavuutta. Hamilton-ruiskuihin otettiin 10-50 µl kutakin standardia.

Ensimmäisen standardin laimennoslasku:

$$q = 100 \text{ ng} / ml$$

$$V = 0,768ml$$

$$m = 2,50mg$$

$$q = \frac{m}{V} = \frac{2,5mg}{0,768ml} = 3,2552mg / ml$$

$$q_1 * V_1 = q_2 * V_2 \Rightarrow V_1 = \frac{q_2 * V_2}{q_1} = \frac{0,1mg / ml * 1000 \text{ nl}}{3,2mg / ml} \gg 32 \text{ nl}$$

13.3 Standardiliuosten laimennoksia

Pipetoidaan 10 mM:sta IPP kantaliuosta 32 µl ja 968 µl ajopuskuria saadaan 100 µg/ml pitoinen standardi. Tästä liuksesta jatketaan laimennosten tekoa. Standardilaimennokset koottiin taulukkoon 4 josta on helppo lukea pipetoitavat volyymit.

Taulukko 4. Standardilaimennosten pipetointiohje laimennoksille, standardisuoran ajoa varten. Määrät laskettu riittävän kahteen 200 µl:n injektointiin tai lisälaimennoksiin kun injektointisilmukka on 200 µl.

Standardi	Volyyymi	puskuri	pitoisuus	Volyyymi	inj. 100 µl	inj. 100 µl
(µg/ml)	(µl)	(µl)	(µg/ml)	(µl)	(µg)	(ng)
100 µg/ml	300	300	50	600	5	5000
100 µg/ml	50	450	10	500	1	1000
10 µg/ml	5	495	0,1	500	0,01	10
10 µg/ml	50	450	1	500	0,1	100
50 µg/ml	25	475	2,5	500	0,25	250
50 µg/ml	15	485	1,5	500	0,15	150
50 µg/ml	50	450	5	500	0,5	500
5,0µg/ml	50	450	0,5	500	0,05	50
5,0µg/ml	5	495	0,05	500	0,005	5
5,0µg/ml	25	475	0,25	500	0,025	25
5,0µg/ml	75	425	0,75	500	0,075	75
1 µg/ml	12,5	487,5	0,025	500	0,0025	2,5
1 µg/ml	37,5	462,5	0,075	500	0,0075	7,5

Standardiliuokset 100, 10, 1,5 ja 1,0 µg/ml tehtiin ajopuskuriin ja ruiskuun otettiin tilavuudet 20-50 µl, jotka vaihtelivat analysoitavan standardin mukaan. Käytettiin kahta erikokoista Hamilton-ruiskua 50 µl:aa ja 500 µl:aa Taulukko 5.

Standardisuora tehtiin testien alussa 10 µg asti, koska injektointiin ruiskusta aina 200 µl 100 µl:n looppiin. Testien loppupuolella tehtiin vain 5 µg:an asti standardisuora. Standardina käytettävää peptidiä ja ajan säästämiseksi injektointiin 10-50 µl:a, samoin tehtiin analysoiduille näytteille.

Yleensä ajettiin vain yksi standardikonsentraatio per kalibraatiosuora. Kulmakerroin laskettiin taulukkolaskenta-ohjelman avulla. Saatu ensimmäisen asteen yhtälö (kaava

10) ratkaistiin x:n suhteen näytteiden kohdalla ja saatiin injektoitiin liuoksen volyymin (µl) sisältämä massa (µg) peptidiä.

Taulukko 5. Standardilaimennosten tekoa varten, laimennokset taulukoitu helpottamaan työtä. Samasta pitoisuudesta injektoidaan eri määrä ruiskulla 100 µl:n silmukkaan, korkeintaan 50 % silmukkaan tilavuudesta

Standardi	Tilavuus	Massa	Massa
µg/ml	µl	µg	ng
100 µg/ml	50	5,000	5000
100 µg/ml	25	2,500	2500
100 µg/ml	20	2,000	2000
100 µg/ml	10	1,000	1000
10 µg/ml	50	0,500	500
10 µg/ml	25	0,250	250
10 µg/ml	20	0,200	200
10 µg/ml	10	0,100	100
1,5 µg/ml	50	0,750	75
1,0 µg/ml	50	0,050	50

$$y = kx + b \Rightarrow x = \frac{y - b}{k} \quad (10)$$

Kulmakertoimen kaava jolla lasketaan näytteen/injektionin sisältämä määrä (µg) peptidiä.

Vain kerran ehdittiin ajaa standardisuora, jossa oli kolme rinnakkaista toistoa jokaisesta standardista. Tämä tehtiin vanhalla PTH-kolonnilla ja käyttäen SMART:ia. Toistotarkkuus ei ollut paras mahdollinen kyseisillä laitteilla juuri silloin, lamput olivat heikossa kunnossa ja vaativat vaihtoa.

13.4 Hydrofiilisen vuorovaikutuksen kromatografian kolonnien koeajot

HILIC-kolonneille tehtiin ajoliuokset Tangin artikkelista löydetyn ohjeen mukaan ja testaukseen otettiin ensiksi Watersin HILIC -kolonni. Artikkelista löydetyn ajoliuosten ja gradienttiohjelman ohjeiden mukaan aloitettiin sopivan gradientin haku. Artikkelissa oli kuitenkin käytetty HILIC-kolonnia, joka oli TSKgel Amide-80-kolonni (5 µm, 1.00 * 250 mm), nyt kokeiluissa kumminkin silikakolonneja. [41.]

Ajopuskurit koostuivat orgaanisesta A-puskurista, jossa 5 % 10 mM ammoniumformaattia (pH 4,5) asetonitrilissä, sekä B-puskurista, jossa oli 10 mM ammoniumformaattia (pH 4,5). Gradientin muokkausta tehtiin vaiheittain, kun oli varmistettu kolonnin toimivan. [41.]

13.4.1 Watersin Atlantis HILIC SILICA (3.0 µm, 2.1 * 100 mm)

HILIC-kolonne, jolla on paljas silika stationäärisfaasina vaatii, että ajopuskurit ovat 5 %:n 10 mM ammoniumformaatti-asetonitrilipuskuri (pH 4,5), ja 10 mM ammoniumformaattipuskuri (pH 4,5). Atlantis kolonne oli otettu käyttöön vuonna 2008, tästä oli merkintä kolonnin säilytyskotelossa. Kokeissa ei saatu kolonnia toimimaan kyseisillä puskureilla. Kolonnin 3 µm partikkeli olisi voinut toimia (ks. 12.4.2.), erona mahdollisesti partikkelin huokoisuus, ÄKTA ei pysäyttänyt koeajoja, kuten teki Waters BEH -kolonnin kanssa (ks. 12.4.3.), joten liian suurta ylipainetta ei syntynyt. Lyhyen kokeilun jälkeen hyllytetään Atlantis-kolonne ja siirryttiin eteenpäin. Mahdollisesti säilytyksen aikana jo kuivunut stationäärisfaasi, jolloin pidempi regenerointi olisi ehkä auttanut. Aika oli niukasti, joten jatkettiin seuraavaan.

13.4.2 Kinetex HILIC SILICA (3.0 µm, 2.1 * 100 mm)

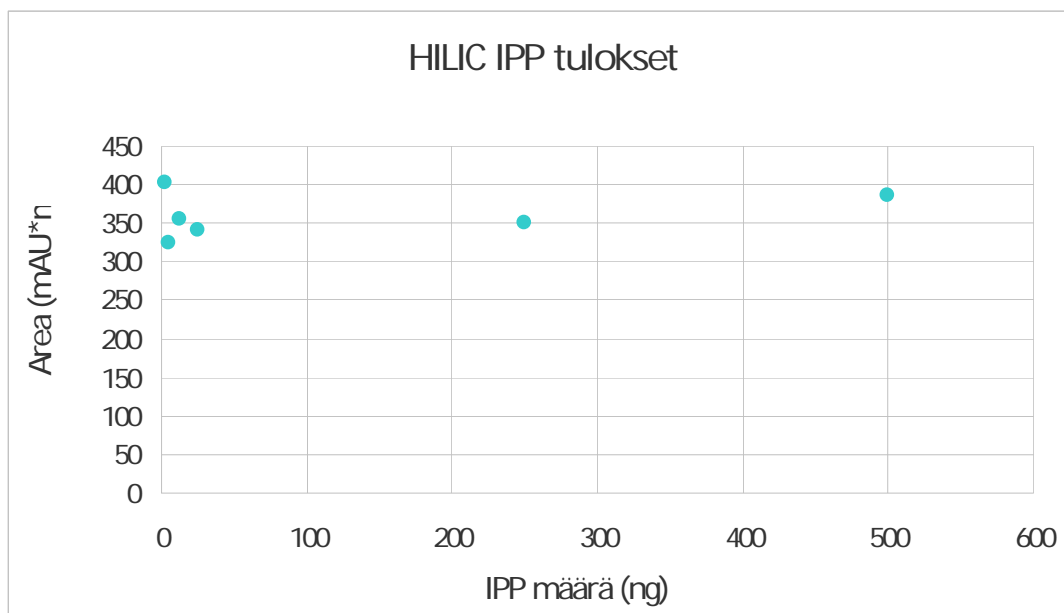
Kokeet tehtiin ÄKTApurifier 10:llä, käyttäen virtausnopeutta 0,2 ml/min. Kolonne antoi ensiksi tuloksia muilla peptideillä, joten siirryttiin käyttämään IPP:tä. Artikkelin eluentit ja gradientti toimivat. Päätettiin muuttaa gradienttia niin että analyytit eluoituaisi aiemmin joka vastaisi paremmin toiveita, piikki eluoitui liian myöhään. Muutettiin asteittain gradienttia jyrkemmäksi, neljäs gradientinmuutos antoi piikin sopivammassa kohdassa. Gradientit ja piikkien eluointi on havainnollistettu liitteessä 5.

Taulukko 6. Standardisuoran IPP:n määrä ng:na, sekä IPP piikin pinta-ala.

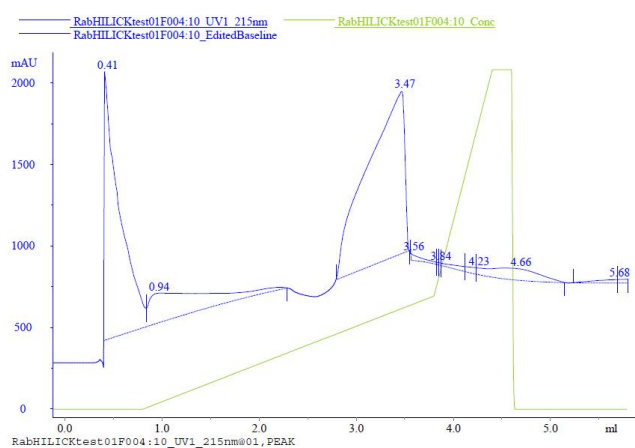
STD massa (ng)	AREA (mAU*ml)
2,5	403,0253
5	324,6584
12,5	354,6641
25	341,0964
250	350,1785
500	386,8135

Eluentit: A-puskuri: 5 % 10 mM ammoniumformaatti (pH 4,5) ACN ja B-puskuri 5 % 10 mM ammoniumformaatti (pH 4,5). Virtausnopeus 0,2 ml/min, analysaattorina oli ÄKTA.

Toimivan gradienttiajon parametrit olivat seuraavat: 0-50 % B-puskuri, 10 min; 50-90 % B-puskuri, 20 min; 90 % pidä (hold) 5 min, 90-0 % B-puskuri, 0,1 min; tasapainotus 4 min 100 % A-puskurilla.



Kuva 20. Kinetex HILIC SILICA:n standardikuvaaja, pienien pitoisuuksien pinta-alat eivät ole suhteessa pieneen massa.



Kuva 21. Kolonni Kinetex HILIC SILICA:n ajo. Kuvan ajon gradientti on kokeilu nro 1:stä eli artikkelin suosittelema ja käyttämä.

Ajettiin gradienttikäyrä käyttäen standardeja ja saatiin tuloksia jotka kerättiin taulukoksi (taulukko 6). Koeajojen myötä nähtiin että piikki on hyvin epäsymmetrinen, eluotui 5 minuutin ajan 0,2 ml/min virtausnopeudella. Piikki oli hyvin epäsymmetrinen ja korkein kohta tulee 3,47 ml:n kohdalla josta jyrkkä lasku takaisin pohjaviivalle (kuva 20). Kootut tulokset koottiin taulukoksi ja tehtiin standardisuora (kuva 19). Standardien pinta-alat olivat kaikki samankokoisia. Ajoja tehdessä siirryttäessä yhä pienempiin pitoisuuksia kohti ja piikkien ollessa selviä pienennettiin koko ajan peptidin määrää, tästä syystä päästiin 2,5 ng:aan asti. Tulos ei ollut luotettava, kolonni oli kontaminoitunut, liiallisella määrällä peptidiä. Injektioilavuutta on vähennettävä, tasapainotusaikaa pidennettävä ajon lopuksi. Tasapainotus jäi nyt kumminkin liian lyhyeksi, virtausnopeudella 0,2 ml/min neljän minuutin tasapainotus on 4,6 CV ja suositus on 10 CV:tä. Gradienttiohjelmiaan on laadittava loppuun 8,5-9 minuutinpitkä tasapainotusaika jos virtausnopeus pidetään 0,2 ml/min. Kuva 20 näyttää eluoituvan IPP:tä sisältävän piikin muodon, joka ei ole tyydyttävä, eluointi jatkui 5 minuutin ajan virtausnopeudella 0,2 ml/min. Gradienttia on haettava uudestaan, jos kyseisellä kolonnilla jatketaan.

13.4.3 Waters Acquity UPLC BEH HILIC

Acquity BEH HILIC -kolonnin kokeilusta tuli hyvin lyhyt kokeilu. Puskurit olivat samat kuten aiemmissa HILIC-kolonneissa. Kokeet alkavat aina samalla tavalla, kolonnin liittämisessä ja tasapainotuksessa. Kolonni liitettiin systeemiin ja eluentin virratessa 0,2 ml/minuutissa. Kolonnin täysin huokoisen partikkelin ja tämän koon vuoksi (1,7 μm) paineet systeemissä nousivat yli 25,0 MPa ja laite pysähtyi. Kolonni ei voitu käyttää ÄKTA:ssa. Tämä kolonni on vain UHPLC-laitteita varten.

13.5 ÄKTA ja C18-kolonnit; PTH ja EVO

13.5.1 ÄKTA:lla ja PTH C18-kolonnilla, kaksi eri gradienttia

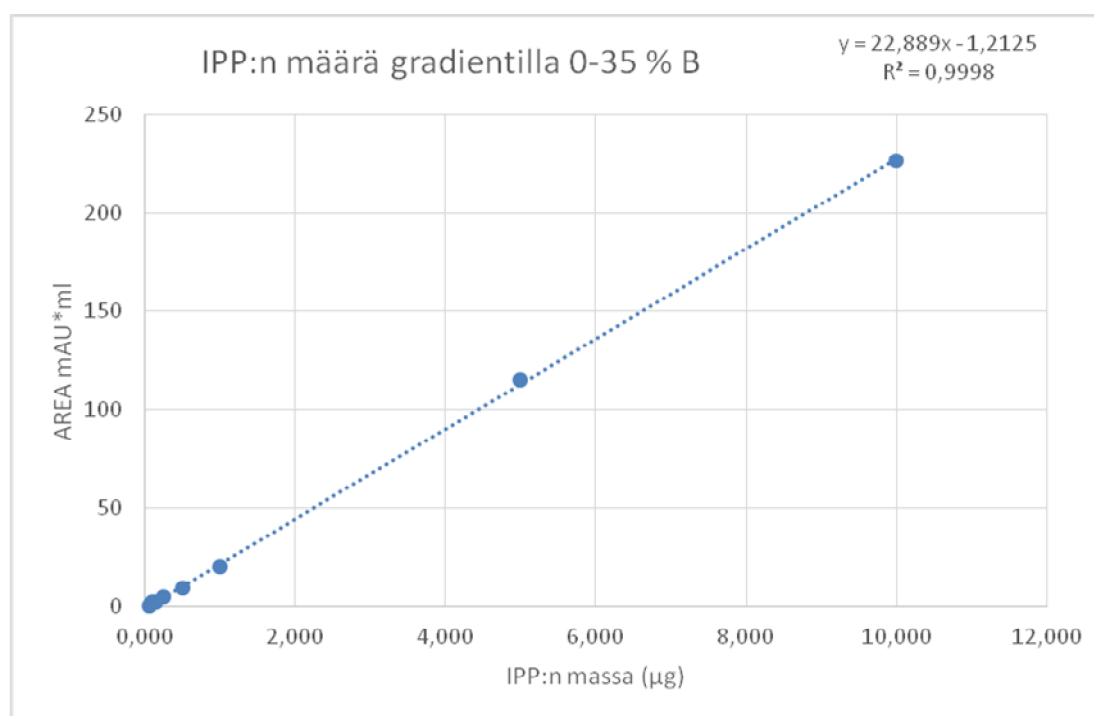
Ajot ja tulokset ÄKTA:lla käyttäen PTH C18-kolonnia. Ajoliuksina puskuri A on 0,1 % TFA:ta ja puskuri B on 0,1 % TFA:ta ACN:ssä. ÄKTA:ssa käytetty virtausnopeus on 0,2 ml/min.

Gradienttajo: 0 % B-puskuria, 1 min, 0-35 % B-puskuria, 20 min, 35-100 % B-puskuria, 2 min., 100 % B-puskuria, 2 min., 100-0 % B-puskuria, 0,1 min ja 0 % B-puskuria, 4 min.

Taulukko 7. Standardisuoran tuloksia PTH C18 ÄKTApurifier10:llä gradientilla 0-35 % B-puskuria.

Retentio (ml)	m (µg)	Area (mAU*ml)	Korkeus (mAU)
3,60	0,050	0,3078	1,865
3,59	0,100	1,9517	6,612
3,59	0,150	1,8772	8,068
3,59	0,250	4,6129	15,823
3,58	0,500	9,3011	31,993
3,60	1,000	20,4627	68,24
3,57	5,000	115,1846	338,403
3,56	10,000	226,8667	651,312

Standardit mitattiin kerran, tulokset on koottu taulukoon 7. Retention keskiarvo oli 3,59 min. Retentio vaihteli hieman kun näytettä oli enemmän, koska piikin epäsymmetrisyys kasvoi näytemäärän mukaan, ehkä oli kolonnin ylitäyttöä. Standardit pysyivät kummin-kin lineaarisuusalueella.



Kuva 22. Standardisuora PTH-kolonnilla gradientilla 0-35 % B-liuosta, ÄKTApurifier10.

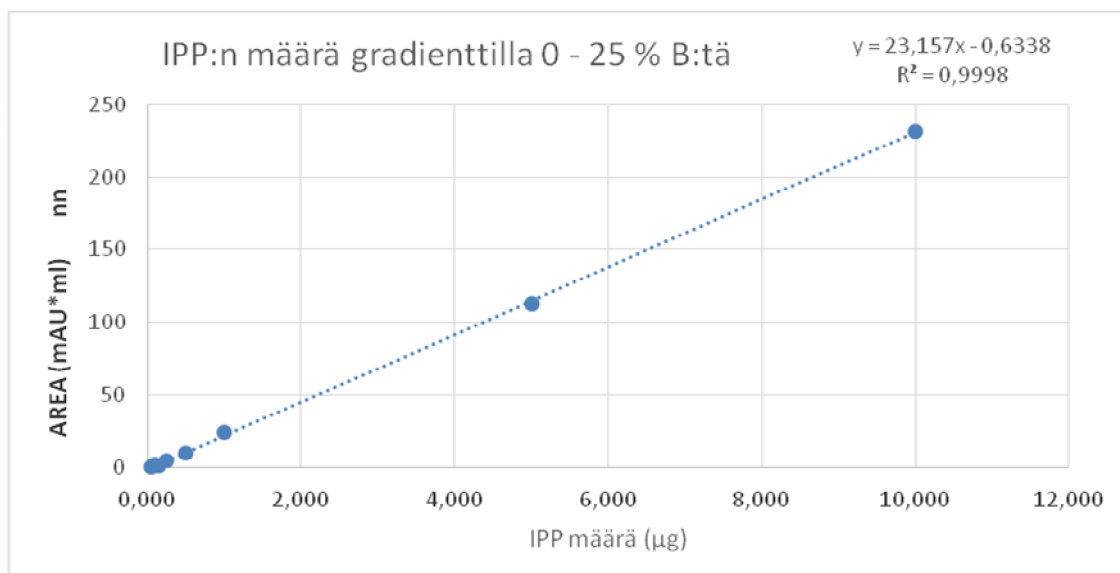
Kalibraatiosuora lineaarinen korrelaatiokerroin (r) oli 0,9999 ja selitysaste (r^2) 0,9998 ja lineaarisuusalue 0,05-10 μg . Tuloksista tehtiin tilastollisia laskelmia Excel- taulukkolaskentaohjelmalla, jotta voidaan varmentaa mittausten oikeellisuutta, tulokset koottu (taulukko 9). Käytettiin LINEST -funktiota, jolla saa useita tilastollisia arvoja kerralla käytettäväksi tulosten laskemiseen.

Seuraavaksi kokeiltiin matalampaa gradienttia, nostettiin B-puskuria vain 25 %:iin 20 minuutin ajan. Gradientti valittiin mahdollisimman lyhyeksi, nousten hieman yli peptidin vaatimaa 15 v-%:n puskuri B:n osuutta eluenttiosuudessa. Näytteen sisältäessä tuskin muita analyyttejä voidaan pitää ajoaika lyhyenä. Standardit mitattiin vain kerran.

Taulukko 8. Gradientti 0-25 % B-eluenttia 20 minuutissa laitteella ÄKTApurifier10

Retentio (ml)	μg	Area (mAU*ml)	Korkeus (mAU)
3,90	0,050	0,424	2,562
4,08	0,075	1,2146	4,218
4,06	0,100	2,4277	6,013
4,01	0,150	1,9466	6,993
4,00	0,250	5,4503	15,322
4,00	0,500	10,3626	29,735
4,01	1,000	24,1244	63,311
3,98	5,000	113,0638	298,905
3,93	10,000	231,8522	584,087

Tulokset ÄKTA:lla gradientille 0-25 % jossa puskuri B:n nosto 20 minuutin ajan olivat lähes samanlaiset kuin gradientilla 0-35 % puskuri B:tä (taulukko 8). Standardien retentioaikojen keskiarvo oli 4,00, eli likimain identtiset. Gradientin korrelaatiokerroin (r) oli 0,9999 ja selitysaste (r^2) oli 0,9995. Ajoliuksina kuten edellisessä ajossa puskuri A on 0,1 % TFA:ta ja puskuri B on 0,1 % TFA:ta ACN:ssä, käytetään ajossa samaa virtausnopeutta eli 0,2 ml/min. Gradienttiajon ajoparametrit ovat 0 % B-puskuria 1 min, 0-25 % B-puskuria 20 min, 25-100 % B-puskuria 2 min., 100 % B-puskuria 2 min. pidä (hold), 100-0 % B-puskuria 0,1 min ja 0 % B-puskuria 4 min.



Kuva 23. Gradientti 2:n kuvaaja, gradientin nousu 0-25 % B-puskuria ÄKTA:lla, 20 min. Selityssaste (r^2): 0,9998.

Taulukko 9. LINEST -funktion tulokset, josta ilmenee kalibraation onnistuminen ja tulosten luotettavuus. Taulukossa esitetty molempien gradienttien tulokset vierekkäin.

	Lyhenne	Gradientti 0-25 %	Gradientti 0-35 %
Kulmakerroin	k	22,74218	22,88943
Leikkauspiste	b	-0,37801	-1,2125
Kulmakertoimen virhe	$s_e(k)$	0,207672	0,120518
Leikkaus-pisteen virhe	$s_e(b)$	0,376919	0,478949
Selityssaste	r^2	0,99950	0,999834
Mittausignaalin residuaali	$s_e(y)$	0,928908	1,143394
F-testi	F	11992,52	36071,74
Vapausaste	df	6	6
Sum of squares regressio	ss reg	10347,98	47158,4
Sum of squares residuaali	ss resid	5,177216	7,844102

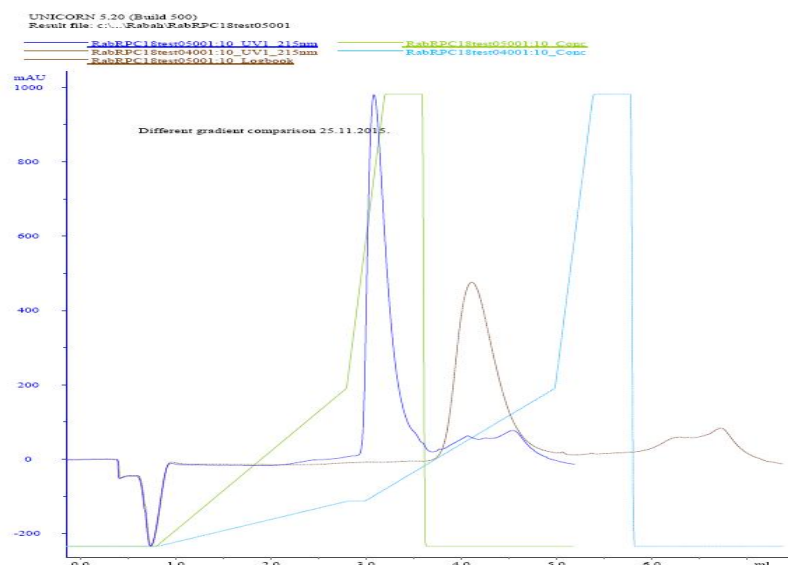
Verrattiin molempia gradientteja käyttäen tilastollista kaksipuolista T-testiä, oletuksena että tulokset ovat samanlaisia eikä eroa ole, hypoteesi nolla. Tulokset osoittivat gradienttien olevan samanlaisia, ei eroa kaksi suuntaisen T-testin P-arvo on 0,978 joka on suurempi kuin 0,05.

Taulukko 10. Gradienttien vertailu parillisen t-testin avulla.

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Gradientti 0-25 %	Gradientti 0-35 %
Mean	48,70645	47,5705875
Variance	6898,465	6738,03492
Observations	8	8
Pooled Variance	6818,25	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	14	
t Stat	0,027512	
P(T<=t) one-tail	0,48922	
t Critical one-tail	1,76131	
P(T<=t) two-tail	0,97844	
t Critical two-tail	2,144787	

ÄKTA:lla ajettiin muutama kokeilu puolet lyhyemmällä gradienttiajalla kuin aiempien ajojen gradienttien nostot. Testattiin ajaa gradientin nostolla 0-35 % B-puskuria 10 minuutin ajan. Piikki eluoitui kapeampana kuin vastaavasti 20 minuutin ajan kokeessa. Koska ei tiedetty miten paljon matriisia näytteet sisältäisivät, tämä gradientti hylättiin (kuva 24). Näytteen ollessa tyhjä muista orgaanisista molekyyleistä, voidaan näytteet ajaa nopealla gradientin nostolla ja siten nopeuttaa analysointia.



Kuva 24. Ajettu ÄKTA:lla sama määrä peptidiä gradienttinostolla 0-35 % B-puskuria mutta eri ajalla, sininen 10 minuuttia ja ruskea 20 minuuttia, nopeampi gradientin nosto antaa kapeamman piikin.

13.5.2 IPP näytteiden tuloksia

Ajettiin gradienttiohjelmalla 0-25 % B-puskurilla näyte 1. A0 kolme rinnakkaista ajoa. A0 näyte on alikvootti Ussingin kammioista, johon annostellaan IPP ja josta peptidi imeytyy suoliston läpi toiseen kammioon. Näytteen keskiarvoksi saatiin 0,593829 mM eli 0,60 mM.

Taulukko 11. Näytteen 1. A0 kolmen rinnakkaisen ajon tulokset.

Näyte	1	2	3
1.A0; AREA (mAU*ml)	232,3999	224,8837	215,8876
V (µl)	50	50	50
m (µg)	10,06301	9,738442	9,349971
n=m/M (µmol)	0,030923	0,029926	0,028732
c (M)	0,000618	0,000599	0,000575
c (mM)	0,618463	0,598515	0,57464

Näytteestä 2. A0 tehtiin kaksi rinnakkaista mittausta ja läpivirratusta kammioista eri aikaan otetuista alikvooteista kerran. Aikaväli oli 0, 30 ja 60 min. 2. A0-konsentraation keskiarvo oli 0,864397 mM eli 0,86 mM. Oletuksena että 1 % alkukammion IPP:stä olisi läpäissyt toiselle puolelle ja näytettä olisi syötetty 50 µl, kuten A0-näytettä, joka antoi 13 µg:aa IPP:tä 50 µl:ssa, niin 1 %:a IPP:tä olisi ollut 0,13 µg eli 130 ng joka on selkeästi havaittavissa tällä menetelmällä. Kalibraatiosuoralla ensimmäinen kalibrointipiste on 50 ng, joten ajossa olisi pitänyt näkyä määriteltävissä oleva piikki. Myös IPP:n määrä kahdessa eri alkukammiossa oli erilaiset 1. A0 pitoisuus oli 0,60 mM ja 2. A0 oli 0,86 mM. IPP:tä lisäävä annostelija Ussingin laitteeseen ei annostele tasaisesti peptidiä, asiakas oli tietoinen ongelmasta.

Taulukko 12. Näytesarjan 2. A0:n näytteiden tulokset. Läpivirtausnäytteissä ei tällä menetelmällä näy peptidiä.

Näyte	2. A0	2. A0	0 min	30 min	60 min
AREA (mAU*ml)	311,9281	340,7518	0	0	0
V (µl)	50	50	50	50	50
m (µg)	13,44227	14,68694			
n=m/M (µmol)	0,041307	0,045132			
C (M)	0,000826	0,000903			
C (mM)	0,826149	0,902645	0	0	0

13.5.3 Standardi IPP -Ringer-liuoksen pitoisuuden määrittäminen

Asiakas oli antanut Ringer-liuokseen tehdyn peptidistandardin. Tämä oli se liuos jota oli lisätty Ussingin laitteessa alkukyvetteihin. Tämän konsentraatio piti varmistaa, asiakkaan putkessa oli merkinnyt 1 µM IPP. Määrittäminen suoritettiin ÄKTA:lla, gradientilla 0-25 %, virtaus ajossa 0,2 ml/min (ks. kuva 15). Standardiliuos on tehty ringerliuokseen.

Taulukko 13. Asiakkaan IPP-standardin (Ringer) ajon tulokset. *) IPP näyte oli laimennettu 1:4 ja analysoitu näyte on tässä kerrottu neljällä

IPP-standardi	Retentio(ml)	Area (mAU*ml)	Analysoitun näytteen massa (µg)	Näytteen massa (µg)
Sample	3,84	704,0352	30,37431	30,37431
Sample 1:4	3,96	185,8457	7,997753	31,99101(*)

Ajettiin standardi kahdesti, ensimmäisen ajon otettiin IPP-ringerliuosta 50 µl:a. Tulos oli hyvin voimakkaan kokoinen piikki. Ajetaan sama näyte uudestaan, nyt laimennettuna 1:4:ään. Laimennettuna piikki sopii standardisuoran lineaariselle alueelle. Standardisuoran tuloksista laskettiin taulukkolaskentaohjelmalla IPP:n standardin standardisuoran kulmakerroin käyttäen kaavaa 10. Saadun kulmakertoimen ja näytteen piikin pinta-alan funktiona avulla laskettiin laimennetun näytteen massa. Kulmakerroin $y=23,158x+0,6164$. Näytteen antamasta piikin pinta-alasta laskettiin kaava 10 avulla standardin pitoisuus (µg).

Kulmakertoimella laskettu analysoitujen näytteiden määrät:

$$y = 23,158x + 0,636 \quad \text{P} \quad x = \frac{185,8457 + 0,636}{23,158} = 7,997 \text{ Laimennettu näyte.}$$

$$y = 23,158x + 0,636 \quad \text{P} \quad x = \frac{704,0352 + 0,636}{23,158} = 30,374 \text{ Laimentamaton näyte.}$$

$$m = 7,997 \text{ ng}$$

$$V = 100 \text{ ml}$$

$$M = 325,42 \text{ ng} / \text{nmol}$$

$$\text{Laimennos: } m_2 = m_1 \cdot \frac{V_2}{V_1} = 7,997 \text{ ng} \cdot \frac{100 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 31,911 \text{ ng}$$

$$n = \frac{m}{M} = \frac{31,911 \text{ ng}}{325,42 \text{ ng} / \text{nmol}} = 0,09806257 \text{ nmol}$$

$$c = \frac{n}{V} = \frac{0,09806257 \text{ nmol}}{100 \text{ ml}} = 0,000981 \text{ nmol} / \text{ml} = 0,983 \text{ mM} \gg 1,0 \text{ mM}$$

Laimentamaton näyte ja laimennettu näyte ovat samansuuruisia, 30,4 ja 31,9 µg:a. Johtuuko laimentamattoman näytteen matalampi tulos siitä että onko 10 µg:n standardipiste olla lievästi lineaarisen alueen ulkopuolella ja siten dynaamisella alueella. Pitoisuus on 1,0 mM IPP:ta ringerissä.

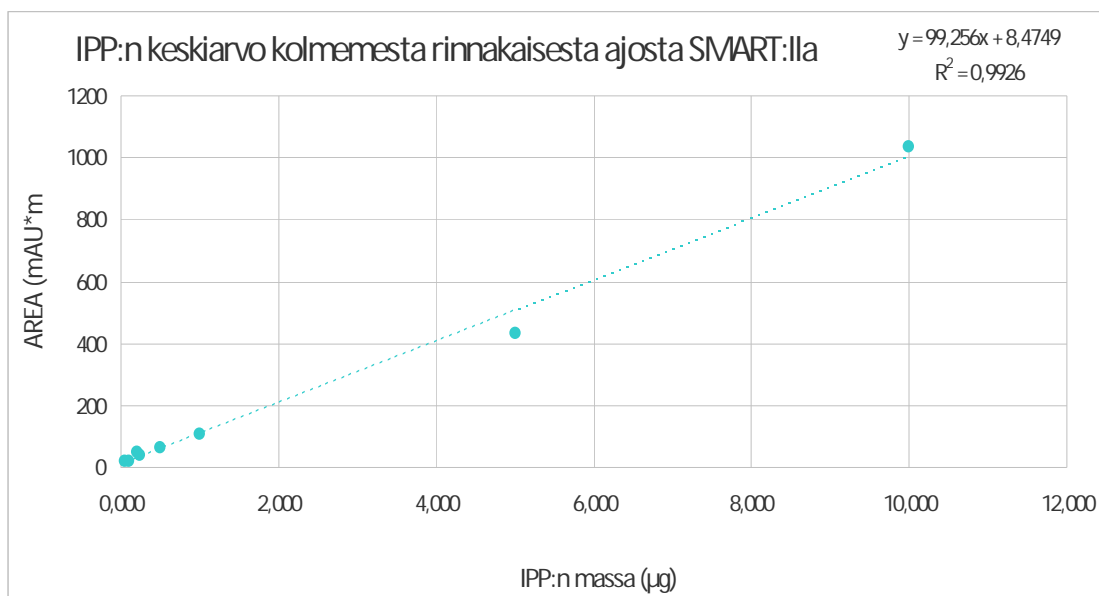
13.5.4 PTH C18-kolonnilla ja SMART:lla suoritettu gradienttijaio

Gradientin nosto 0-35 % B-puskuria 20 minuutin ajan. Jokaista standardia tehtiin kolme toistoajoa PTH C18-kolonnilla käyttäen. Laskettiin kolmesta ajosta piikkien pinta-alojen keskiarvot, josta tehtiin standardisuora (kuva 25). Korrelaatiokerroin oli 0,9963 (r) ja selitysaste (r²) oli 0,9926. Käytettiin LINEST-funktiota suoran luotettavuuden arviointiin. Tulokset on esitetty taulukossa 14. Tehtiin myös kuvaaja mittausten raakadatasta tämä esitetty kuvaajassa 26.

Taulukko 14. Kolmen rinnakkaisen ajon keskiarvoista tehty kahdeksan pisteen standardisuora. Kulmakerroin: 99,2559x+8,4749, (r): 0,9963 ja (r²): 0,9926.

massa (µg)	Area (min*mAU)
0,050	17,736933
0,100	19,13763
0,200	47,56517
0,250	36,44820
0,500	65,47757
1,000	109,10633
5,000	434,38197
10,000	1035,22167

Ajoja varjosti kuitenkin ajoittainen ongelma liittyen valotien epästabiilisuus, joka sai valotien pohjaviivan sahaamaan ja aiheuttamaan useiden ajojen uusinta-ajoja, koska dataa ei voitu käyttää. Muutamia ajoja häiriö kiusasi ajon alussa rauhoittuen ennen analyysin eluointia joten datan saaminen onnistui.

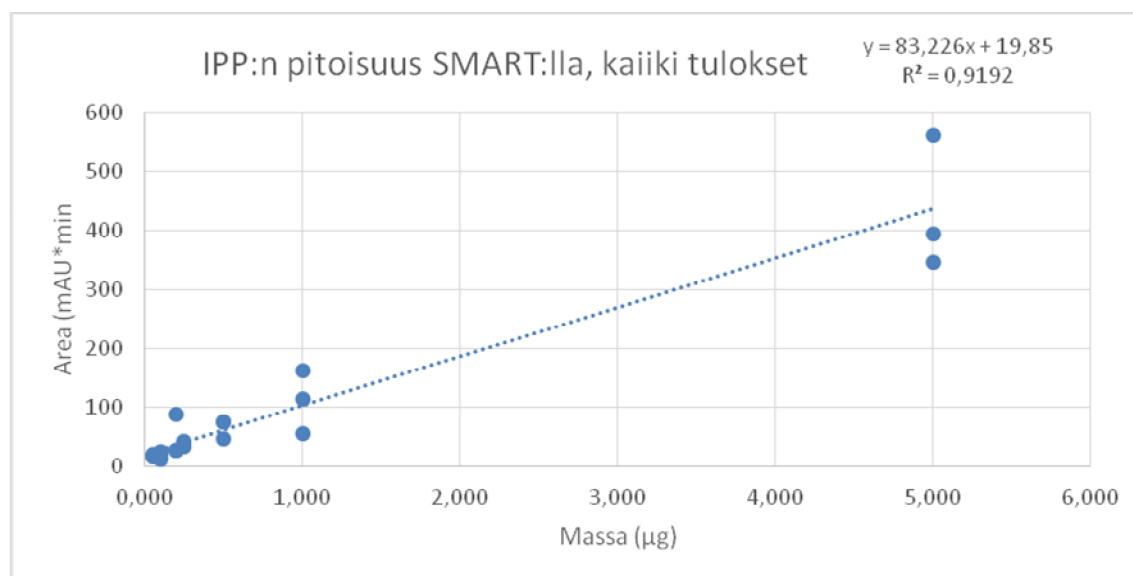


Kuva 25. Smart ja kolonni PTH C18 ajo, keskiarvot kolmesta ajosta kahden eri SMART:lla. Ajoa kiusasi rauhaton pohjaviiva. Myös Smart Assistant:in ohjelman pohjaviivan integrointi oli välillä hankalaa toteuttaa.

Syyt pohjaviivan rauhattomuuteen saattoivat olla ajoittainen ilmakupla läpivirtauskyvetissä, valonlähteitä heijastavan peilin moottorin rasvan puute tai lamppujen toimimattomuus. Myös Smart Assistant-ohjelman jäykkyys pohjaviivan määrittämisessä johti suuriin heittoihin rinnakaisissa mittauksissa. Ohjelmalla ei pystynyt selkeästi rajamaan ja laskemaan pohjaviivaa standardin pinta-alaa varten. Seuraavan polven laitteisto ÄKTA:lla oli mahdollista tehdä paremmat analyysit. Mahdollinen kolonnin ylitäyttö voi heikentää tulosta ja 10 µg:n standardi kannatta hylätä.

Taulukko 15. LINEST-funktion tulokset SMART:lla ja PTH C18-kolonnin ajo, jossa standardeista on tehty kolme rinnakkaista määrittystä.

	Lyhenne	SMART
Kulmakerroin	k	99,2559435
Leikkauspiste	b	8,474854
Kulmakertoimen virhe	$s_e(k)$	3,49341971
Leikkaus-pisteen virhe	$s_e(b)$	13,884146
Selitysaste	r^2	0,99262225
Mittaussignaalin residuaali	$s_e(y)$	33,1071793
F-testi	F	807,25643
Vapausaste	df	6
Sum of squares regressio	ss reg	884821,923
Sum of squares residuaali	ss resid	6576,51192



Kuvaja kertoo rinnakaisten ajojen välisistä heitoista. Tässä selitysaste (r^2) nousee 0,919 jos 10 µg:n mittaukset olisi laskettu mukaan, tulos jäisi (r^2) 0,851:een.

13.6 Tulokset X Bridge

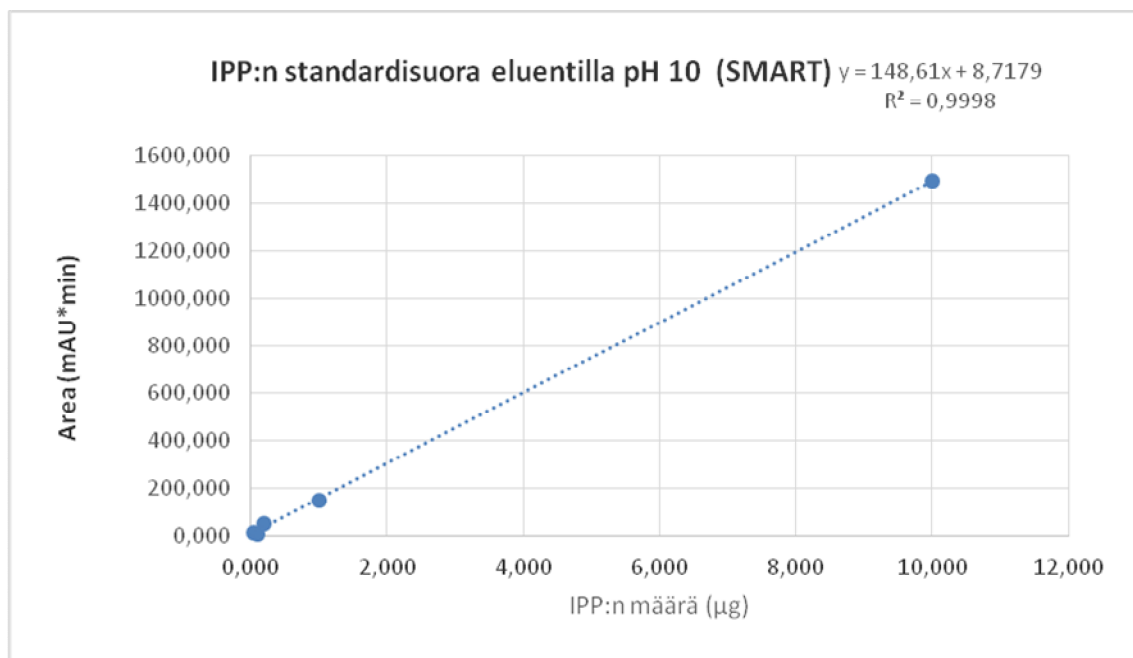
X Bridge-kolonilla haluttiin tutkia, miten peptidi eluoituu alkalisella eluentilla. Kyseinen menetelmä on ollut pitkään käytössä ja ollut toimivana. Pohjana oli ensiksi vain puskurien reseptit. SMART:lla aloitettiin tekemään astettainen gradientt ajo manuaalisesti määrittämään orgaanisen eluentin pitoisuutta, jolla saadaan peptidi eluoitumaan. Piikki eluoitui 20 v-% kohdalla, joten jatketaan käyttämällä 20 v-% B-puskuria.

Gradienttiajo antoi epästabiilin pohjaviivan SMART:lla, josta ei voinut erottaa analyytin piikkiä. Tehtiin isokraattisen ajon tyylinen gradienttiajo, jossa nostettiin pikaisesti B-puskurin osuus 20 %:iin ja pidetään tässä seossuhteessa 20 minuuttia, tämän jälkeen lisätään B-puskurin osuutta 100 %:iin parissa minuutissa, sekä pidetään tässä kaksi minuuttia jonka jälkeen B-puskurin osuus lasketaan 0 %:iin minuutissa ja tasapainotetaan kolonnia 4 minuuttia A-puskurilla lopuksi. Tämä isokraattinen ajo 20 v-% B-liuosta antoi erinomaisen hyvin kapeasti eluoituvan piikin. Tehtiin seuraavaksi gradienttiajo jossa nostettiin B-puskuria 25 %:iin 25 minuutissa, siitä nopea nousu 100 %:iin kahdessa minuutissa, pidettiin kaksi minuuttia puhtaassa B-puskurissa, jonka jälkeen jyrkkä pudotus puhtaaseen A-puskuriin 4 minuutiksi. Ajettiin vuorotellen isokraattista- sekä gradienttiajoa, tulos oli aina samanlainen, isokraattien toimi, gradientti ei antanut tulosta. Esimerkkinä muutama kromatogrammi isokraattisista ajoista liitessä 4.

Taulukko 16. Isokraattisen ajon viiden pisteen standardisuora. Kulmakerroin $y = 148,61x + 8,7179$, korrelaatiokerroin (r) 0,9998, selitysaste (r^2) 0,99976.

Standardin massa (µg)	Retentio (min)	Area (mAU*ml)
0,050	24,33	17,031
0,100	24,55	11,9139
0,200	24,24	53,8544
1,000	24,39	152,3961
10,000	24,36	1495,0899

Ajossa gradientti nostettiin nopeasti 5 minuutissa 0 sta 20 %:iin B-puskuria ja pidettiin tässä 20 minuuttia, jonka jälkeen asetonitriliin (B-puskuri) pitoisuus lisättiin 2 minuutissa 100 %:iin ja pidettiin tässä 2 minuuttia jonka jälkeen asetonitrili vähennettiin 0,1 minuutissa 0 %:iin ja tasapainotettiin 4 minuuttia A-eluentilla ennen seuraavaa ajoa. Kalibraatiopisteitä vain 5 kappaletta keskitetty hyvin pieniin pitoisuuksiin ja standardisuoran lineaariseen yläpäähän lähelle dynaamista aluetta. Tulokset koottu taulukkoon 16, retentiokeskiarvo 24,38 minuuttia ja menetelmän standardisuora esitettynä kuvaajassa 27.



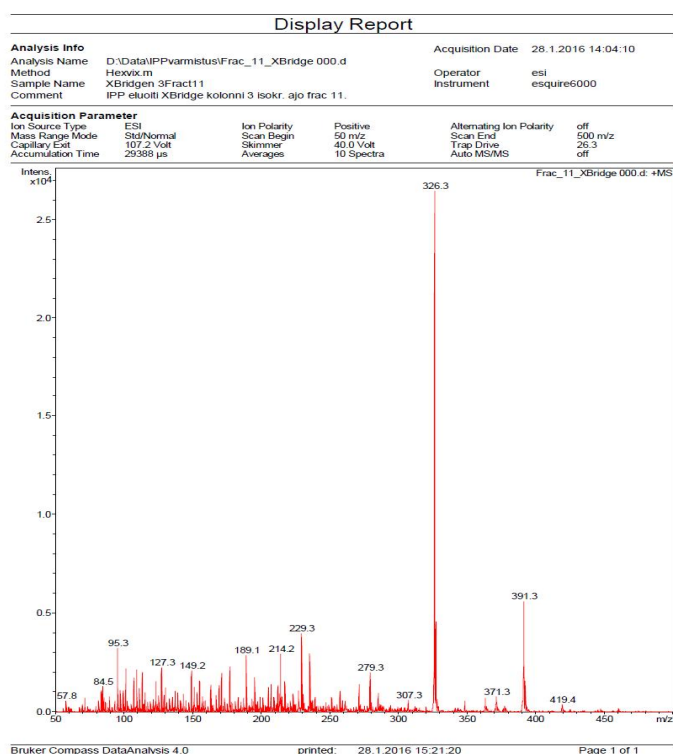
Kuva 26. SMART:illa ja X Bridge -kolonnia käytetty standardisuora. Ajo tehty isokraattisella ajolla, piikki kapea. Tässä korrelaatiokerroin (r) on 0,9999 selitysaste (r^2) on 0,99976.

Taulukko 17. LINEST funktiolla saadut tulokset SMART -laitteistolla ja X Bridge -kolonnilla ja puskurilla (pH 10) ja isokraattisella ajolla.

	Lyhenne	X Bridge
Kulmakerroin	k	148,6075
Leikkauspiste	b	8,717907
Kulmakertoimen virhe	$s_e(k)$	1,328872
Leikkaus-pisteen virhe	$s_e(b)$	5,974087
Selitysaste	r^2	0,99976
Mittaussignaalin residuaali	$s_e(y)$	11,53044
F-testi	F	12505,92
Vapausaste (n-2)	df	3
Sum of squares regressio	ss reg	1662675
Sum of squares residuaali	ss resid	398,8531

Fraktio 11, eluotui n. 24 minuutin kohdalla, fraktio jatkoanalysoitiin Esquierilla (ESI/MS) ja todettiin fraktion sisältävän IPP:tä. Tämä näkyi myös Smartilla tehdyillä muutamilla ajoilla, jossa oli injektoitu eri määrä IPP-standardia ja intergoinnissa eluoituva piikin pinta-ala oli erikokoinen. Näistä muutamista ajoista kertyi materiaalia viiden pisteen standardisuoksi. Fraktion F 11 varmistus ajoista on tehty Esquierilla (kuva 28).

ESI/MS-tulokset varmistivat piikin olevan IPP:tä. Ennen analysointia fraktiosta tehtiin laimennokset, ettei peptidi kontaminoisi laitetta ja jouduttaisiin avaamaan ja puhdistamaan laitteen sumutinpäätä. Analysoitiin kaksi valittua fraktiota kahdesta eri ajosta. Ajolla varmennettiin että piikki on IPP:tä. Molemmat fraktiot olivat ajosta, jossa oli tasainen 20 minuutin isokraattinen ajo jossa oli 20 % B-puskuria lisänä, ennen gradientin nopeasta nostosta 100 %:iin kolonnin puhdistusta varten. Analysoitiin fraktio F11 kahdesta eri ajosta, ja MS-spektrissä näkyi massavarauksella 326 (m/z) piikki, joka on IPP:n molekyylipaino ja vety ($325 + 1$), fraktio eluoiutui 25,03 minuuttin kohdalla virtauksen ollessa 0,1 ml/min.



Kuva 27. Bruker Esquire-massaspektrometrin raportti ajosta, jossa liikkuvana faasina on 20 mM ammoniumformaatti:ACN (pH 10). IPP on korkein piikki (m/z) 326,3 Da.

SMART:ien lamput ei lopulta toimineet kunnolla, menetelmä siirrettiin lopulta ÄKTA:lle. Standardisuora yritettiin lopulta tehdä käyttäen sekä gradienttia että isokraattista ajoa. Tulosta ei saatu tehtyä. ÄKTA:n pumput eivät toimineet kunnolla, SMART oli huollon alla, lamput on tilattu, tulivat huhtikuun lopussa. ÄKTA:n pumput vaativat huoltoa, eivät pystyneet tuottamaan pulssitonta virtausta. Puhdistin perusteellisesti sekä A- että B-eluentin resiprookkipumput, jotka nyt puhdistuksen jälkeen toimivat kumminkin heikosti ja aiheuttavat hieman paineen vaihteluja. Peptidin piikki eluoiutui

usein hyvin myöhään, kromatogrammin lopussa, tasapainotusvaiheen aikana joka viittaa siihen että pumput eivät toimi kunnolla.

13.7 Kinetex EVO C18-kolonne

Kuten kaikilla aiemmilla testatuilla C18-kolonneilla, samat eluentit toimivat samalla tavalla. Gradienttia lähdettiin hakemaan muuttamalla gradienttia eri tavoin. Pidettiin ÄKTA:an normaali virtausnopeus 0,2 ml/minuutissa kaikissa kokeiltuissa gradienteissa. Injektoitava standardin määrä pidettiin kaikissa 3 µg IPP:tä. Kolonne on kokeen pisin, 250 mm pitkä, vain pituus saa aikaan muutoksia gradientin ajoaikaan. Ajetut gradienttien ohjelmat taulukoituna (Liite 3). Standardisuora tehty myös virtaukselle 0,2 ml/min kun gradientti oli valittu. Gradientin valinnan jälkeen vertailtiin eri virtausnopeuksia ja virtauksen vaikutusta eluutioon ja kolonnin massansiirtotehokkuuteen. Gradientin sopivuus määritettiin pohjaluvulla (N), pohjan korkeuden (H) että piikin epäsymmetrisyydellä (AS). Valittiin gradienttiajo nro 3. Seuraavassa oli vielä käytetyt kaavat. Tulokset ovat koottu taulukkoon 18.

$$N = 16 * \frac{t_r^2}{t_w}$$

$$H = \frac{L}{N}$$

$$AS = \frac{B}{A}$$

Taulukko 18. Jokaisesta ajosta määritettiin pohjaluku (N), pohjan korkeus (H) sekä piikin (3µg) epäsymmetrisyys. Gradientiajossa 3 oli pohjaluku suurin, ja pohjan korkeus pienin, epäsymmetrisyys on suurempi mutta ei vielä häiritse analyysiä.

EVO C18	Pohjaluku (N)	Pohjan korkeus (H)	Epäsymmetrisyys (AS)
Gradientti	16*(tr/W) ²	L/N (L=250 mm)	B/A
2	819,632	0,305	2,870
3	1059,864	0,236	3,235
4	943,855	0,265	3,800
5	714,716	0,350	4,643

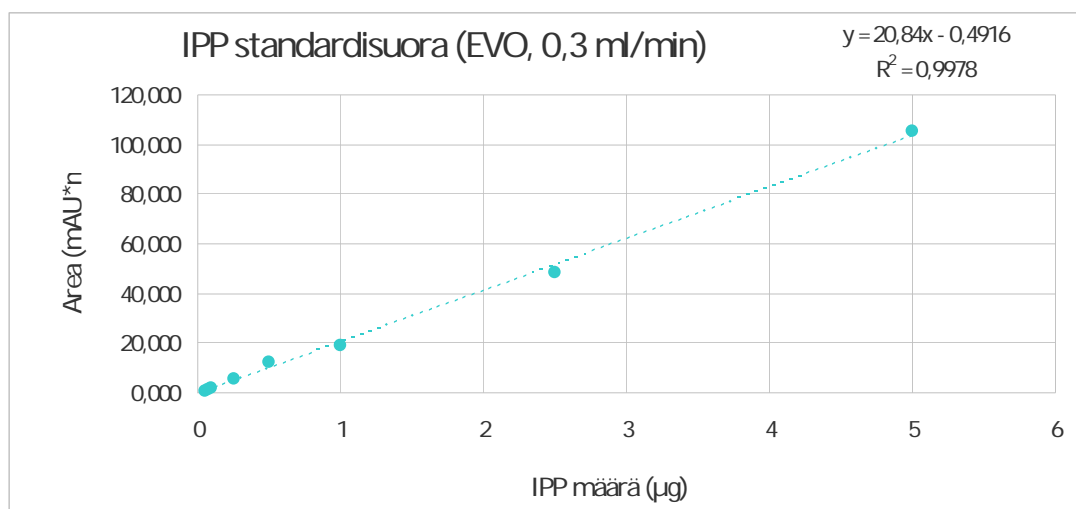
Ajettiin gradientti 3 eri virtausnopeuksilla 0,2, 0,4 ja 0,6 ml/min jonka jälkeen laskettiin N, H ja AS. Tuloksia vertailtiin ja valittiin virtauksella 0,3 ml/min. Tästä tehtiin standardisuora (taulukko 19).

Taulukko 19. Kinetexin pitkän 25 cm kolonnin standardisuora. Virtausnopeus 0,3 ml/min. Retention vaihtelut johtuvat eri ajopäivistä. Mukan taulukossa myös piikin korkeus sekä piikin alku ja loppu pituudet ilmoitettuna millimetreissä.

	Retentio	Alku	Loppu	Pinta-ala	Korkeus
µg	(ml)	(ml)	(ml)	(mAU*ml)	(ml)
0,05	5,92	5,76	6,19	0,787	3,649
0,075	5,92	5,81	6,18	0,946	5,250
0,1	5,92	5,80	6,19	1,571	8,148
0,25	5,92	5,79	6,29	5,425	23,895
0,5	5,92	5,77	6,40	11,994	49,407
1	6,10	5,97	6,69	19,175	75,494
2,5	5,89	5,76	6,56	48,246	194,253
5	5,91	5,77	6,60	105,383	411,147

Standardisuora ajettiin valitulla gradientilla 3 sekä virtausnopeudella 0,3 ml/min. Gradientiajon ohjelmaluettavissa liitteessä 3.

Standardisuora oli seitsemän pisteen kalibraatiosuora sisältäen IPP-standardit 0,05-5,0 µg:a.



Kuva 28. Standardisuora virtausnopeudella 0,3 ml/min ja gradientti 3. Selitysaste (r^2): 0,9978.

Taulukko 20. LINEST-funktion tulokset EVO C18-kolonnista virtausnopeudella 0,3 ml/min.

	Lyhenne	EVO C18
Kulmakerroin	k	20,8401
Leikkauspiste	b	-0,49158
Kulmakertoimen virhe	$s_e(k)$	0,398238
Leikkaus-pisteen virhe	$s_e(b)$	0,80367
Selitysaste	r^2	0,997814
Mittaussignaalin residuaali	$s_e(y)$	1,840475
F-testi	F	2738,509
Vapausaste	df	6
Sum of squares regressio	ss reg	9276,283
Sum of squares residuaali	ss resid	20,32409

Muutama piikki varmistettiin Esquireilla. Tulos on yhtäläinen muihin Esquiereilla ajettuihin tuloksiin, piikki on IPP:ta. Sen vahvistaa massaspektrometrissä näkyvä 326 (m/z) piikki.

14 Päätelmät ja pohdinta

Koska tässä työssä haettiin optimaalista kolonnia ja puskurin yhdistelmää, ei keskitytty tekemään menetelmälle kontrollinäytettä. Menetelmälle ei myöskään määritetty määrittäysrajaa, menetelmä oli riittävän tarkka saamaan luotettava signaali molemmilla laitteilla tarvittavaan 50 ng injektointia massaa IPP:tä. Kyseisten laitteiden pohjaviivan analysointi tähän tarkoitukseen ei onnistunut, laitteet eivät olleet suunniteltu kyseiselle toiminnalle.

Käytännössä mikä tahansa C18-kolonne yhdistettynä 0,1 % TFA-ACN eluenttiparilla toimii IPP:n erotuksessa. Kolonnin on kestävä noin 2,5 pH:ta, jonka TFA:n lisäys tekee puskurille. MALDI:n tuloksiin peilaten, peptidi ei retentoi kolonnin stationäärifasiin täydellisesti, vaan peptidiä löytyy jo useita fraktioita ennen selvää absorptiopiikkiä aallonpituudella 214/215 nm. Peptidi saadaan näin näkymään erittäin herkillä analysaattoreilla, kuten MALDI:lla. Ajan salliessa suunnitelmiin olisi pitänyt ottaa myös muita C18-kolonneja ja kokeilla peptidin määrittystä emäksisellä ammoniumformaattipuskurilla (pH 10). Ennen testausta pitää varmistaa valmistajan antamista tiedoista kolonnin pH-kestävyys. Käyttämällä väärää pH:ta voi tuhota kolonnin tai ainakin lyhentää kolonnin elinkaarta (ks kolonnin käyttöohjetta).

Paras tulos saatiin X Bridge C18-kolonnilla käyttäen emäksistä puskuria ja isokraattisella gradientilla, piikki oli korkea ja kapea, ei vyöhykkeen leventymistä. Emäksinen puskuri sai peptidin varauksen negatiiviseen suuntaan, ja alifaattinen sivuketju retentoi paremmin peptidin kolonnin stationäärifaasiin. Puskuri on saattanut peptidin aminohapotähteet yhden varauksen emäksiseen muotoon, joka on retentiolle parempi kuin hapollinen muoto. Piikki eluoituu kapeampana kuin happaman puskurin kanssa. Menetelmästä on tehty työohje peptidin analysointia varten ks. (Liite 1.)

Analyysiin voi käyttää mitä tahansa C18-kolonnia, joka kestää pH 10:n olosuhteita. Gradientin säätö on suoritettava ennen analysointia ja standardisuoran tekoa uuden kolonnin kohdalla, huomioiden kolonnin pituuden. Puskurin vahva kantaliuos on säädetty käyttämällä ammoniakia. Ammoniakki on helposti haihtuva ja kannattaa päivittäin tarkastaa ajoliuosten pH ennen päivän alkua ja säätää pienellä ammoniakillisällä pH 10:een, samoin kantaliuoksen säätö ennen ajoliuoksen tekoa.

Kokeilisin myös ajaa X Bridge C18-kolonnilla ja emäksisellä puskurilla suoraan isokraattista ajoa jossa puskuri sisältäisi 20 mM ammoniumformaattia ja 20 % asetonitriiliä. Nostaisin virtausnopeutta ja näin lyhentäisin ajoaikaa ja nopeuttaisin näytteiden analysointia. Tämä toimisi myös hyvin ÄKTA:ssa jos pumppuongelmat jatkuvat tai uusiutuvat, ei ole tarvetta käyttää gradienttia ja kahta pumppua, selviää yhdellä pumpulla.

Kinetexin EVO-kolonne (C18, 250 mm) toimin hyvin. Kolonnilla haettiin kapeampaa piikkiä ja saatiin nostettua virtausnopeutta, jonka ÄKTA:n takapaine salli vaarantamatta erotustehokkuutta. Tästä tehtiin toinen työohje ks. (Liite 2.)

Kehittelisin menetelmää happamalla puskurilla ja C18-kolonnilla, eteenpäin siten, että lyhentäisin ja nopeuttaisin gradienttijaon erottelevaa osaa esimerkiksi 0-25 % B-puskuri noston jo 10:ssä minuutissa. Tämä on mahdollista ja toimii, jos tutkittava näyte ei sisällä muita häiritseviä molekyylejä kuin analyyyttiä. Käyttäen Kinetexin Core Shell -kolonneja, jotka ovat kiinteäytymisiä partikkeleita, voidaan nostaa virtausnopeutta ja tällä tavoin nopeuttaa myös ajoaikaa joka nopeuttaa tulosten valmistumista tutkimuksessa jopa 0,4-0,6 ml/min.

HILIC-kolonne on toiminnallinen, sopiva puskuri ja gradientti 4 toimivat, ei valitettavasti ehditty hakemaan oikeata injektiomäärää, joka ei ylikuormittaisi kolonnia. Suurin ongelma nyt kokeilussa oli kolonnin ylitäyttö. Toimivan Kinetexin HILIC-kolonnin tyhjä

tilavuus (CV) oli 0,173 ml (173 µl) ja 100 µl:n standardin injektointi on n. 60 % kolonnin tyhjästä tilavuudesta. Ylitäytön merkkejä ovat leveät piikit, jaetut piikit ja suuret piikit olivat epämuodostuneita (Liite 5, gradientti 3). Pienemmällä standardin ja näytemäärän injektoimisella voidaan saada aikaan toimiva ohjelma, ajon loppuun olisi suotava kolonnin tasapainottua 8,5-9 minuuttia. [9 s. 191-193].

Suosittelen ÄKTA:n käytössä jatkuvaa ylläpitohuoltoa. Viikonloppuun suosittelen kolonnin irrotusta ja veden ajoa systeemin läpi, jotta saadaan eluentiliuosten puskurien suolat poistettua. Eluentin vaihdossa kannattaa suosia putkiston huuhtelua vedellä. Kerran kuussa on suoritettava pumppujen puhdistus, kuten ohjekirja muistuttaa. Kannattaa reagoida herkästi pumppujen paineen heilahteluihin ja sonikoida palloventtiilit, sillä ne tukkeutuivat helposti. Pumppuongelmiin suosittelisin pitämään varalla erilaisia tiivisteitä, joita voidaan herkästi vaihtaa. Ohjekirjan mukaisten säännöllisten puhdistusten suorittaminen säännöllisin väliajoin on ehdottomasti tarpeen, jotta saadaan aikaan luotettavia tuloksia ja vältetään huoltotoimenpiteitä, jota suorittaa valtuutettu huolto. Vuosihuolto säännöllisin väliajoin on jatkuvan toiminnan kannalta suositeltavaa.

Lähteet

- 1 van der Pijl, P. C., Kies, A.K., Ten Have. G. A. M., et al. Pharmacokinetics of proline in the pig. 2008. Science Direct, Peptides 2008 (29): 2196-2202.
- 2 Clarke, L. L., 2009. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol (296): G1151-G1166.
- 3 Pärssinen, R., Suominen, I., Haajanen, K. 2012. Biogeeni, ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Suomi, Tampere: Juvenes Print-Suomen Yliopistopaino Oy.
- 4 Brachten kometen leven op aarde? Volkssterrenwacht Urania. Belgia. <<http://www.urania.be/astronomie/dossiers/komeetison/levenopaarde>> Luotu 2014. Verkkodokumentti. Luettu 15.1.2016
- 5 Solunetti: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/aminohappojen_lyhenteet/2/> Luotu 2006. Verkkojulkaisu (opiskelusivusto). Verkkodokumentti. Luettu 19.1.2016.
- 6 Hagel, L., Jagschies, G., and Sofer, G. 2008. Handbook of Process Chromatography, Development, Manufacturing, Validation and Economics, 2nd ed. Academic Press, Yhdistyneet Kuningaskunnat, Lontoo-The Netherlands, Elsevier Ltd.
- 7 Jaarinen, S., Niiranen. J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5-6 painos. Suomi, Helsinki-Edita Publishing Oy.
- 8 Kuipers, B. J. H., Gruppen, H. 2007. Prediction of Molar Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High- Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. Journal of agricultural and food chemistry 55: s. 5445-5451.
- 9 Riekola, M-L., Hyötyläinen, T. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat, 2 painos. Helsinki, Yliopistopaino.
- 10 Yang, Y., Boysen, R. I., Harris, S. J., Hearn, M. T. W. 2009. J. Chrom. A 1216: 3767-3773.
- 11 Spicer, V., Yamchuk, A., Cortens, J., et al. 2007. Sequence-Specific Retention Calculator. A Family of Peptides Retention Time Prediction Algorithms in RP-HPLC. Anal. Chemistry 79: 8762-8768.

- 12 L-isoleucine. PubChem.Open Chemistry database.
<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6306>.> Verkkojulkaisu. Luettu 11.1.2016.
- 13 L-isoleucine. PubChem.Open Chemistry database. Picture
<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6306>.> Verkkojulkaisu. Luettu 11.1.2016
- 14 L-Proline. PubChem.Open Chemistry database.
<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/145742>.> Verkkojulkaisu. Luettu 11.1.2016.
- 15 L-Proline. PubChem.Open Chemistry database. Picture
<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/145742>.> Verkkojulkaisu. Luettu 11.1.2016.
- 16 Harris, D. C. 2010. Quantitative Chemical Analysis International 3rd ed. U.S.A. N. Y. Freeman & Co.
- 17 Ardrey, B., 2003. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, An Introduction. Great Britain, Bodmin, MPG Books
- 18 Core Shell Science.Phenomenex.
<<https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>.> Luotu 2016. Verkkodokumentti. Luettu 11,1,2016.
- 19 GE healthcare. Äkta™design Course Book. 2009. General Electric Company- 1.8.2009 s. 19-20. Ruotsi, Uppsala.
- 20 ÄKTA™ design Course Handbook. 2009. GE, s. 91. Germany. 09/2009.
- 21 Getting Started in HPLC. Section 2B. HPLC Pumps. HPLC luentomateriaali.
<<http://www.lcresources.com/resources/getstart/2b01.htm>.> Luotu 2000. Verkkodokumentti. Luettu 21.1.2016.
- 22 Micro HPLC Pump. <<http://thalesnano.com/h-cube-series/microhplcpump>.> Luotu 2013. Verkkodokumentti. Luettu 19.1.2016.
- 23 LC Packings Ultimate nano HPLC connected to the Bruker EsquireHCT Ion Trap.
<<http://penyfan.ugent.be/labo/joelv/Esquire.html>.> Verkkodokumentti. Universiteit Gent, Ghent, Belgia. Luettu 26.2.2016
- 24 Hillenkamp, F., Peter-Katalinic, J. 2007. MALDI MS, A Guide to Instrumentation, Methods and Application. Saksa, Weinheim.

- 25 MALDI-TOF/TOF: Bruker Ultraflex II TOF/TOF. Mass Spectrometry Laboratory. <<http://www.mslab.ulg.ac.be/equipment/maldi-toftof-bruker-ultraflex-ii-toftof-april-2005/>> Luotu 2005. Verkkodokumentti. Luettu 26.2.16.
- 26 Bruker Daltonics Ultraflex MALDI TOF/TOF Mass Spectrometer. Biocompare. <<http://www.biocompare.com/Product-Reviews/41296-Bruker-Daltonics-Ultraflex-MALDI-TOF-TOF-Mass-Spectrometer/>> Copyright 1999-2016. Verkkodokumentti. Luettu 26.2.16
- 27 Calza, G. A MALDI-MSI approach to generate proteomic signatures of Primary Glomerulonephritis: Preliminary Findings. 2015. Thesis Keskusteltu. 6.10.2015. University of Milan, Faculty of Medicine. Milan, Italy.
- 28 Proteomics Core Facility. MALDI-TOF/TOF-MS protocols. University of Hawaii. <<http://blog.hawaii.edu/proteomics/files/2012/09/Peptide-mass-fingerprint-by-MALDI-workflow.pdf>>. Luotu 2012. Verkkodokumentti. Luettu 26.2.2016.
- 29 Buszewski, B., Noga, S., 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) — a powerful separation technique. Anal. Bioanal. Chem. 402: 231-247.
- 30 Yoshida, T. 2004. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. J. Biochem. Biophys. Methods 60: 265-280.
- 31 Hunkapiller M. W. 1985. User Bulletin, Applied Biosystems, Protein Sequencer, No. 14 Nov, 18, 1985, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 1985
- 32 Care and use manual Atlantis, T3, DC18 and HILIC SILICA Columns. Waters. <<http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/736000640.pdf>>. Luotu 2007. Verkkodokumentti. Luettu 28.2.2016
- 33 Kinetex Care and Use Manual. Phenomenex. <http://phx.phenomenex.com/lib/il69771209_1.pdf>. Luotu 2010. Verkkodokumentti. Luettu 28.2.2016
- 34 Care and Use Manual for UPLC BEH Columns. Waters. <<http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001371.pdf>>. Luotu 2014. Verkkodokumentti. Luettu 28.2.2016.
- 35 Care and Use Manual. Certificate of Acceptance XBridge Batch Nr: 133. Waters. 2012. <http://www.waters.com/waters/en_FI/XBridge-Columns/nav.htm?cid=513767&xcid=ext569&gclid=CJeri6Tk-coCFebDcgodfillmQ&locale=en_FI>. Luotu 2012. Verkkodokumentti. Luettu 15.2.2016
- 36 BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology. Waters. <http://www.waters.com/waters/en_US/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en_US>. Luotu 2016. Verkkodokumentti. Luettu 16.2.2016.

- 37 Kinetex. Colum Care and Optimization Notes
<https://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/il69770315_w_care.pdf
>. Luotu 2015. Verkkodokumentti. Luettu 15.2.2016.
- 38 Garcia, M. C. 2005. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 825: 111-123.
- 39 Garcia, M. C., Hogenboom, A. C., Zappey H. & Irth, H. 2002. Effect of the mobile phase composition on the separation and detection of intact proteins by reverse-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 957: 187-199.
- 40 Song, Y., Schowen, R. L., Borchardt, R. T. & Topp, E.M. 2001. Effect of 'pH' on the rate of Asparagine Deamination in Polymeric Formulations: 'pH'-Rate Profile. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90: 141- 156.
- 41 Tang, Y., Li, R., Lin, G. & Li, L. 2014. PEP Search in MyCompoundID: Detection and Identification of Dipeptides and Tripeptides Using Dimethyl Labeling and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 86: 3568-3574.

IPP:n analysointi SMART:lla käyttäen X Bridge C18-kolonnia

Työohje tripeptidi IPP:n analysointi ja kvantitointi SMART:lla.

M (IPP) = 325,24 g/mol.

Puskurit: A: 20 mM Ammoniumformaatti : B: ACN

Kolonnei: Waters X Bridge C18 (5 µm, 4.6 * 150 mm)

Eluentit:

Kantaliuos Ammoniumformaatti 200 mM väkevänä (1000 ml):

- 15,57 ml Ammoniakkia 25 % (HPLC grade)
- 1,62 ml Muurahaishappoa (HPLC grade)
- 900 ml H₂O (HPLC grade)

Säädä ammoniakilla pH 10:ksi, siirrä dekanterilasista mittapulloon ja täytä merkkiin. Ajoittain kannattaa tarkastaa liuoksen pH, se voi muuttua ja näkyä peptidin piikin leviämisenä.

Puskuri A:

- 90 ml H₂O (HPLC grade)
- 10 ml 200 mM ammonium formaattia (pH 10)

Puskuri B:

- 60 ml ACN (HPLC grade)

SMART: Virtausnopeus 0,1 ml/min. Analysointi aallonpituus 214 nm. Tasapainota kolonnia ainakin 10 CV a puskurilla ennen analyysin alkua.

Ajo-ohjelma: Smart Assistant: X Bridge01

Gradientti: 0-20 % [B] 0-5 minuuttia; 20 % [B] hold 20 minuuttia; 20-100 % [B]- 2 minuuttia; 100 %:[B] hold 2 minuuttia 100-0 % [B] 0.1 minuuttia: 0 % hold 4 minuuttia ennen seuraavaa ajoa (tasapainotus).

Standardit: ks laimennosstandarditaulukko

Kantaliuos 10 mM IPP (H₂O)

Standardi laimennokset 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1,5 µg/ml ja 1,0 µg/ml. Laimennettu ajopuskuriin A.

Standardi	Tilavuus	Massa	Massa
µg/ml	µl	µg	ng
100 µg/ml	50	5,000	5000
100 µg/ml	25	2,500	2500
100 µg/ml	20	2,000	2000
100 µg/ml	10	1,000	1000
10 µg/ml	50	0,500	500
10 µg/ml	25	0,250	250
10 µg/ml	20	0,200	200
10 µg/ml	10	0,100	100
1,5 µg/ml	50	0,750	75
1,0 µg/ml	50	0,050	50

Standardisuora 50, 75, 100, 200, 500 ng, 1,0 ja 5,0 µg taulukkolaskentaohjelmalle ja tee analyysit.

µg	Ret (min)	Area (mAU*ml)
0,050		
0,100		
0,250		
0,500		
1,000		

5,000		
-------	--	--

Käytä Hamilton ruiskua. Injektoi tarvittavat määrät IPP:tä standardisuoraa varten. Laske esimerkki injektoinnista. Aja standardit, tarvittaessa kolmesti, ja laske mittausten keskiarvo ja seuraavaksi kulmakerroin, josta lasketaan näytteiden pitoisuudet. Ota huomion laskuissa näytteen injektoitu volyymi.

$$y = kx + b \Rightarrow x = \frac{y - b}{k}$$

Analysoi standardit käyttäen LINEST funktiota, jolla saat keskiarvon, keskihajonnan ja mittaussignaalin virheen eli residuaalin keskihajonnan ym. tarvittavat tilastolliset arvot.

Laske näytteen rinnakkaismittauksista vähintään keskiarvo (x) ja keskihajonta (s). Käytä 95 % luotettavuusarvoa $t_{0,05}$ (kaksipuoleinen testi) ja laske sitten näytteiden tulokset käyttäen kaavaa:

$$m = \bar{x} \pm t_{0,05} \cdot \frac{s}{\sqrt{n-1}}$$

LINEST-funktion antamien arvojen paikat:

Kulmakerroin	Leikkauspiste
Kulmakertoimen virhe	Leikkaus-pisteen virhe
Selitysaste	Mittaussignaalin residuaali
F-testi	Vapausaste (n-1)
Sum of squares regression	Sum of squares residuaali

IPP:n analysointi ÄKTA:lla käyttäen EVO C18-kolonnia

Työohje tripeptidi IPP:n analysointi ja kvantitointi ÄKTA:lla.

M (IPP) = 325,24 g/mol.

Puskurit: A: 0,1 % TFA : B: 0,1 % TFA ACN

Kolonne: Kinetex EVO C18 (5 µm, 4.6 * 250 mm)

Eluentit:

Säädä ammoniakilla pH 10:ksi, siirrä dekanterilasista mittapulloon ja täytä merkkiin. Ajoittain kannattaa tarkastaa liuoksen pH, se voi muuttua ja näkyä peptidin piikin leviämisenä.

Puskuri A:

- 100 ml H₂O (HPLC grade)
- 100 µl TFA

Puskuri B:

- 100 ml ACN (HPLC grade)
- 100 µl TFA

ÄKTA: Virtausnopeus 0,3 ml/min. Analysointi aallonpituus 215 nm. Tasapainota kolonnia ainakin 10 CV A-puskurilla, ennen analyysin alkua. ÄKTA:n pumppuongelmien vuoksi voidaan käyttää B-puskurina ACN (60 %) : H₂O (40 %) sekoitusta, jolloin pumppu toimii.

Ajo-ohjelma: Unicorn 5.2 ohjelma, EVO 3.

Gradientti ohjelma jos käyttää B-puskurissa on vain 0,1 % TFA ACN:ää:

Gradientti: 0-15 % [B] 0-5 minuuttia; 15-45 % [B] 25 minuuttia; 45-100 % [B] 2 minuuttia; 100 %: [B] hold 2 minuuttia 100-0 % [B] 0.1 minuuttia: 0 % hold 4 minuuttia ennen seuraavaa ajoa (tasapainotus).

Gradientti ohjelma jos B-puskuriin tarvitaan lisätä vettä:

Gradientti: 0-30 % [B] 0-5 minuuttia; 30-60 % [B] 25 minuuttia; 60-100 % [B] 2 minuuttia; 100 %: [B] hold 2 minuuttia 100-0 % [B] 0.1 minuuttia: 0 % hold 4 minuuttia ennen seuraavaa ajoa (tasapainotus).

Standardit:

Kantaliuos 10 mM IPP (H₂O)

Standardi laimennokset 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1,5 µg/ml ja 1,0 µg/ml. Laimennettu ajo-puskuriin A.

Standardi	Tilavuus	Massa	Massa
µg/ml	µl	µg	ng
100 µg/ml	50	5,000	5000
100 µg/ml	25	2,500	2500
100 µg/ml	20	2,000	2000
100 µg/ml	10	1,000	1000
10 µg/ml	50	0,500	500
10 µg/ml	25	0,250	250
10 µg/ml	20	0,200	200
10 µg/ml	10	0,100	100
1,5 µg/ml	50	0,750	75
1,0 µg/ml	50	0,050	50

Standardisuora 50, 75, 100, 200, 500 ng, 1,0 ja 5,0 µg. taulukkolaskentaohjelmalle ja tee analyysit

µg	Ret (min)	Area (mAU*ml)
0,050		
0,100		
0,250		
0,500		
1,000		
5,000		

Käytä Hamilton ruiskua. Injektoi tarvittavat määrät IPP:tä standardisuoraa varten. Las-
kuesimerkki injektoinnista. Aja standardit, tarvittaessa kolmesti ja laske keskiarvo ja
seuraavaksi kulmakerroin, josta lasketaan näytteen pitoisuudet. Ota huomion las-
kuissa näytteen injektoitu volyymi.

$$y = kx + b \Rightarrow x = \frac{y - b}{k}$$

Analysoi standardit käyttäen LINEST funktiota jolla saat keskiarvon, keskihajonnan ja
mittaussignaalin virheen eli residuaalin keskihajonnan ym. tarvittavat tilastolliset arvot.

Laske näytteen rinnakkaismittauksista vähintään keskiarvo (x) ja keskihajonta (s). Käy-
tä 95 % luotettavuusarvoa $t_{0,05}$ (kaksipuoleinen testi) ja laske sitten näytteen tulokset
käyttäen kaavaa:

$$m = \bar{x} \pm t_{0,05} \cdot \frac{s}{\sqrt{n-1}}$$

LINEST-funktion antamien arvojen paikat:

Kulmakerroin	Leikkauspiste
Kulmakertoimen virhe	Leikkaus-pisteen virhe
Selitysaste	Mittaussignaalin residuaali
F-testi	Vapausaste (n-1)
Sum of squares regression	Sum of squares residuaali

Gradientin etsintä Kinetex EVO kolonnilla

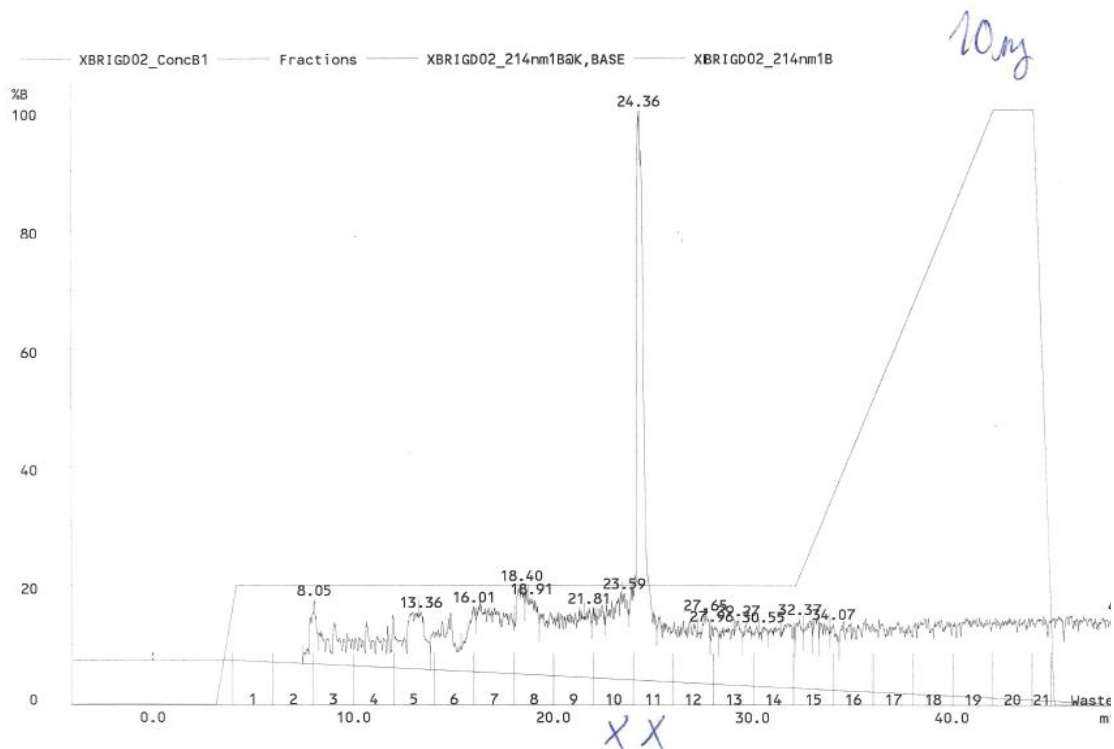
Taulukoituna eri gradientit jota kokeiltiin EVO kolonnilla.

EVO 2	0-60 % B	25 min	60-100 % B	5 min	100% B	hold 5 min	100-0 % B	0,1 min	0 % B	hold 4 min		
EVO 3	0-30 % B	5 min	30-60 % B	25 min	60-100% B	2 min	100% B	hold 2 min	100-0 % B	0,1 min	0 % B	hold 4 min
EVO 4	0-30 % B	10 min	30-60 % B	20 min	60-100% B	2 min	100% B	hold 2 min	100-0 % B	0,1 min	0 % B	hold 4 min
EVO 5	0-100 % B	25 min	100% B	hold 2 min	100-0 % B	0,1 min	0 % B	hold 4 min				

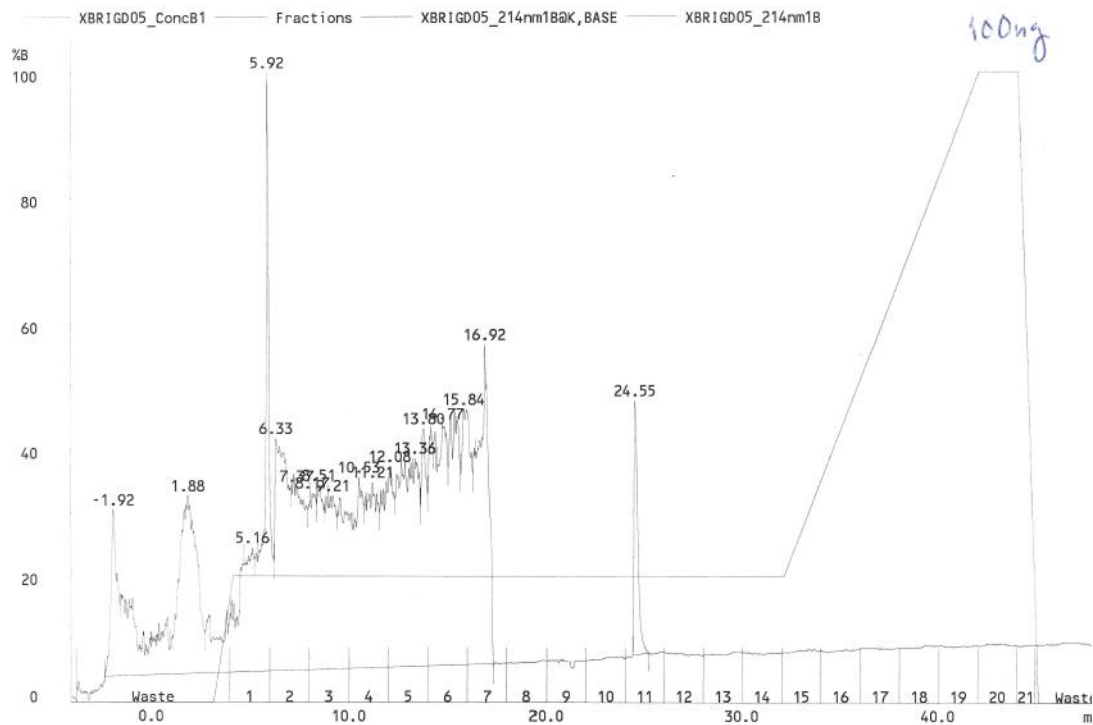
Taulukoituna gradienttien tulokset. Lisää vielä asymmetrisyys.

EVO C18	massa	AREA	Korkeus	Ret	alku	loppu	erotus W	Pohjaluku N	Pohjan korkeus H	Asymmetrisyys AS
Gradientti	µg	mAU*ml	ml	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	$16 \cdot (tr/W)^2$	L/N	b/a
2	3	67,34	245,40	6,37	6,14	7,03	0,89	819,63186	0,30501498	2,870
3	3	62,63	261,73	5,86	5,69	6,41	0,72	1059,8642	0,23587928	3,235
4	3	76,13	382,72	5,53	5,38	6,10	0,72	943,85494	0,26487121	3,800
5	3	70,51	317,13	5,28	5,14	5,93	0,79	714,71623	0,34978917	4,643

Liite 4. X Bridge-kolonne ja isokraattisen ajon tuloksia

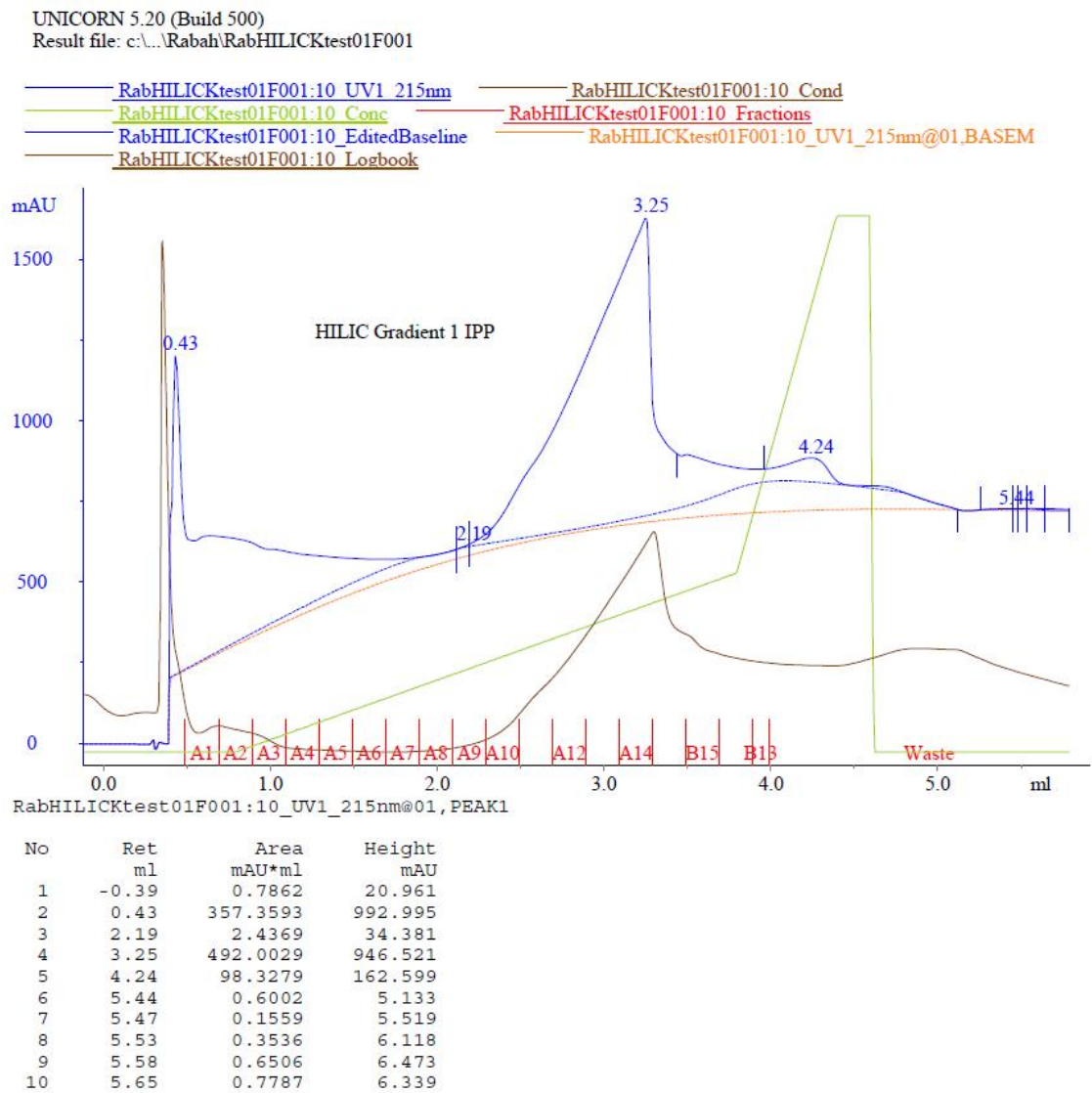


Smart-laitteella ajettu käyttäen X Bidge-kolonnia ja ammoniumformaattipuskurilla (pH 10) ja B-puskuri puhdas ACN, isokraattinen ajo jossa lopussa on kolonnia puhdistustava B-puskurin nosto 100 %:iin. Piikki 24,36 minuutin kohdalla, injektoitu 10 µg IPP:tä. Fraktiot 10 ja 11 otettu talteen, F11 analysoitu ja varmistettu sen sisältävän IPP:tä.

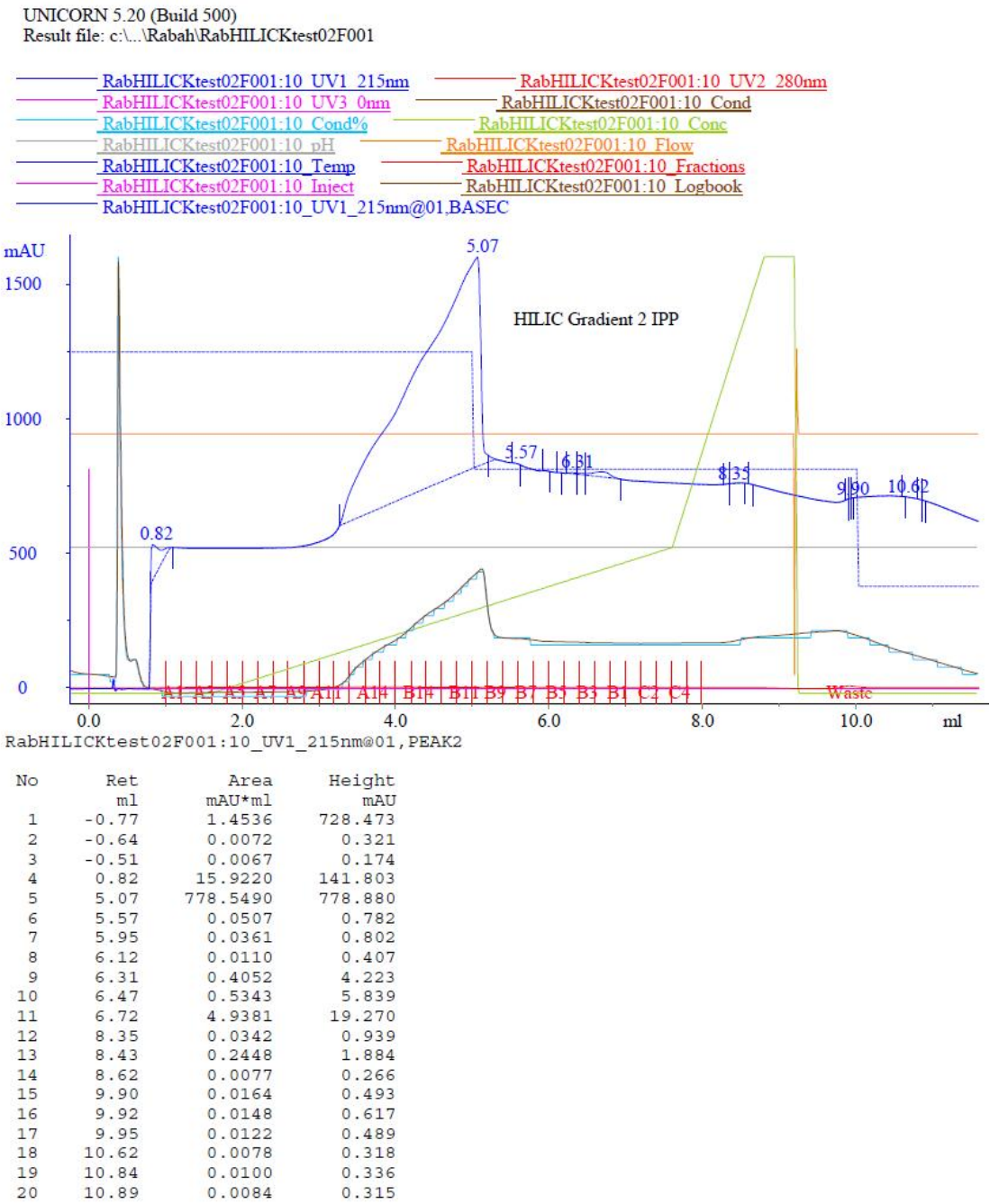


Smart-laitteella ajettu käyttäen X Bridge-kolonnia ja ammoniumformaattipuskurilla (pH 10) ja B-puskuri puhdas ACN, isokraattinen ajo jossa lopussa on kolonnia puhdistusta B-puskurin nosto. Piikki 24,55 minuutin kohdalla, injektioitu 100 ng IPP:tä. Huomioi epästabiili 214 nm:n pohjaviiva analyysin alussa.

Liite 5. Kinetex HILIC SILICA:n eri gradienttia



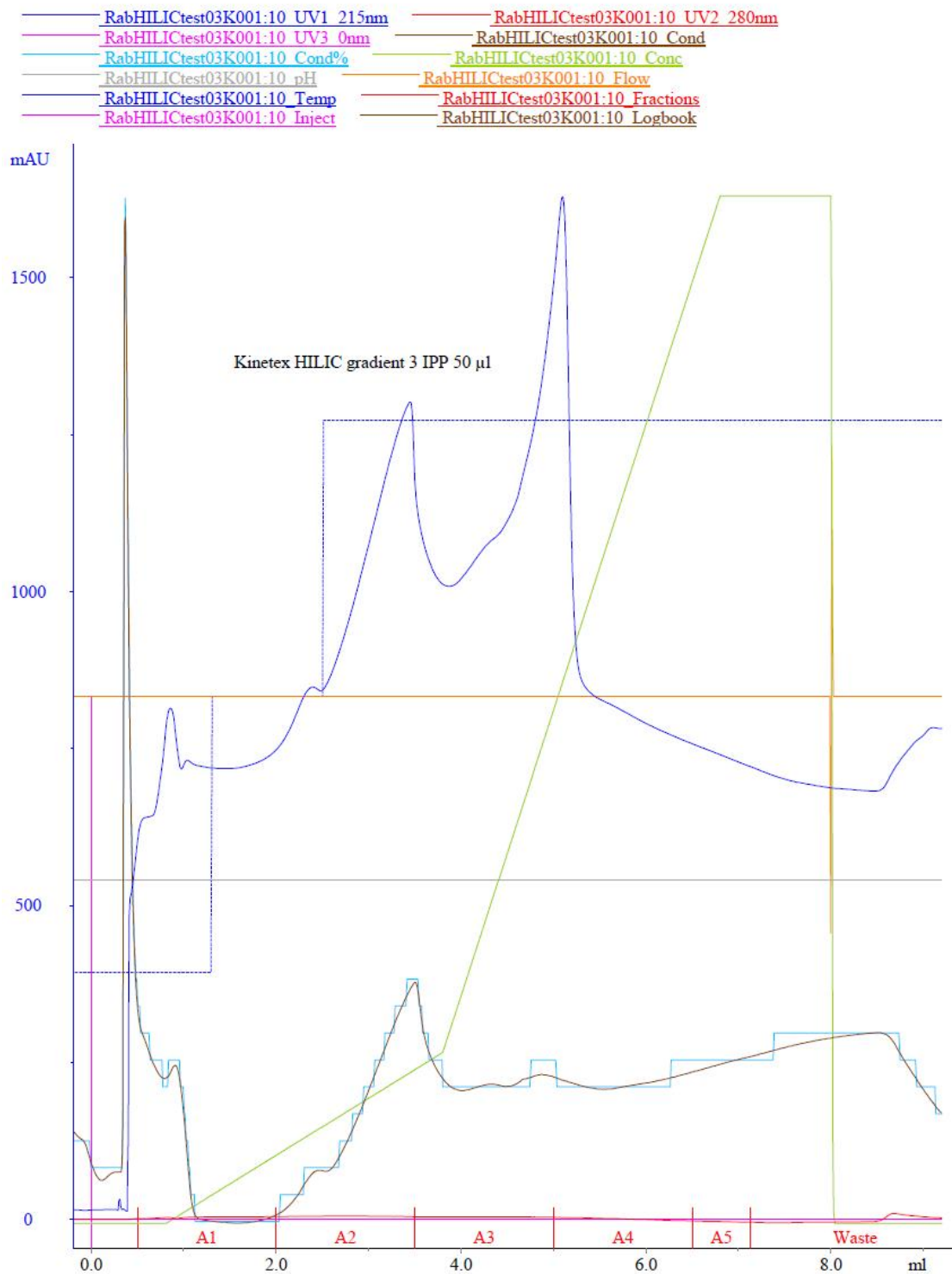
Gradientti muutos 1. Vaalean vihreä linja on gradientti, sininen on aallonpituus 215 nm:n absorptiokäyrä, huipun ollessa 3,25 ml:n kohdalla. Fraktionkeräys 200 µl.



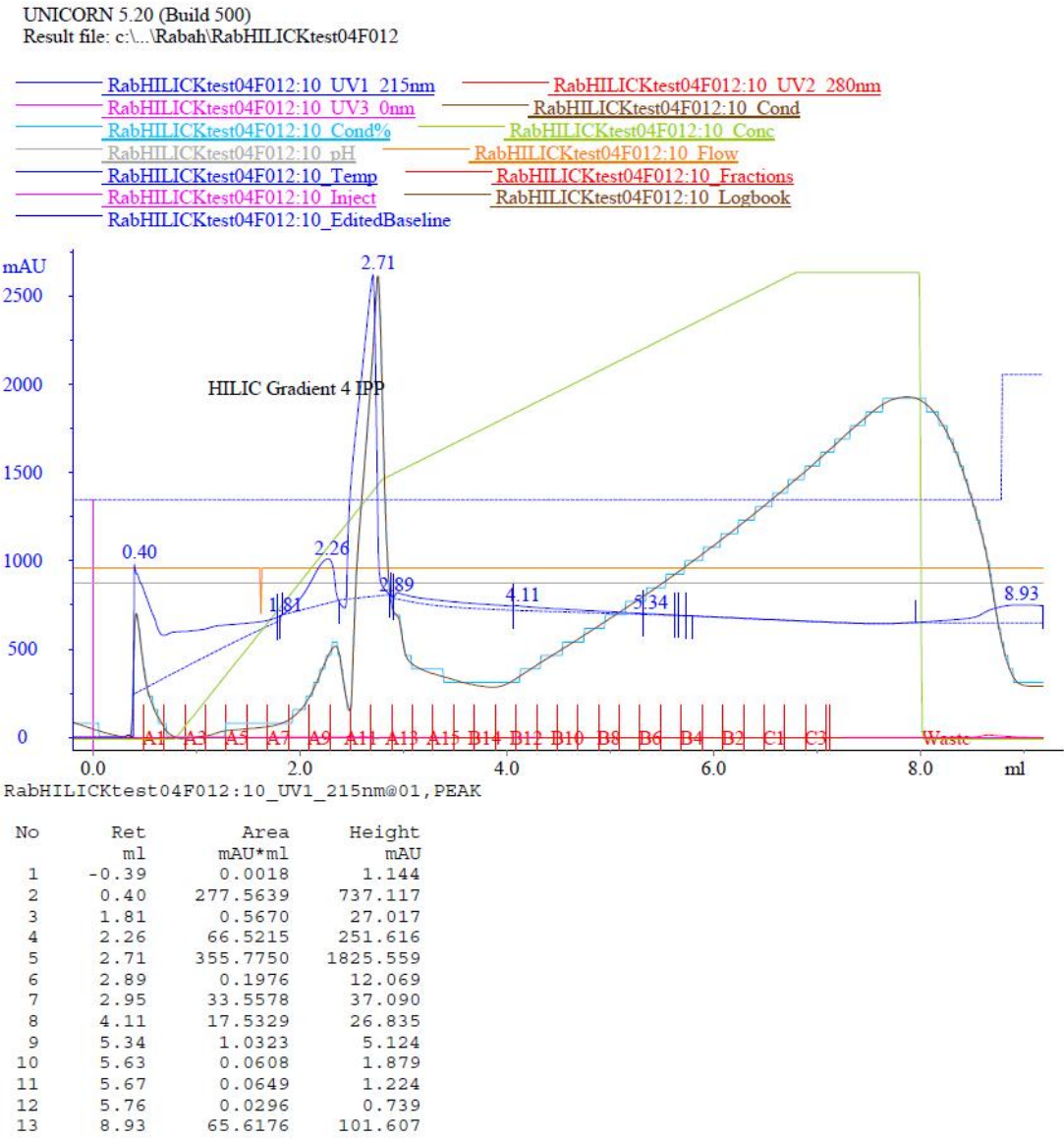
Gradienttimuutos 2. Vaalean vihreä linja on gradientti, sininen on aallonpituus 215 nm:n absorptiokäyrä, huipun ollessa 5,07 ml:n kohdalla. Fraktion volyymi 200 µl.

UNICORN 5.20 (Build 500)

Result file: c:\...\Rabah\RabHILICtest03K001



Gradientti muutos 3. Vaalean vihreä linja on gradientti, sininen on aallonpituus 215 nm:n absorptiokäyrä, piikejä oli kaksi kappaletta. Fraktion keräyksen volyymi 1,5 ml. Esimerkki kolonnin ylitäytöstä.



Gradientti muutos 4. Vaalean vihreä linja on gradientti, sininen on aallonpituus 215 nm:n absorptiokäyrä, huipun ollessa 2,71 ml:n kohdalla. Fraktionkeräys 200 µl.